

UNTERSUCHUNGEN ZUR
STRUKTUR DER PHYTOCHROM-CHROMOPHORE
UND ZUR
PARTIKELBINDUNG VON PHYTOCHROM

SIEGBERT GROMBEIN

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553812_0006

UNTERSUCHUNGEN ZUR
STRUKTUR DER PHYTOCHROM-CHROMOPHORE
UND ZUR
PARTIKELBINDUNG VON PHYTOCHROM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Siegbert Grombein
aus
Trier

1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 8. April 1976

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und seine verständnisvolle Unterstützung bei ihrer Durchführung durch wertvolle Ratschläge und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. D. Marmé vom Institut für Biologie III der Universität Freiburg danke ich für die Einführung in die Arbeitstechnik der Partikelbindung von Phytochrom sowie wertvolle Anregungen bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Ch. Harzer danke ich für die gewissenhafte und geschickte Assistenz bei der Durchführung zahlreicher Versuche.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1. Lichteffekte	1
1.2. Phytochrom-Entdeckung und Isolierungsversuche	1
1.3. Phytochrom, ein Chromoprotein	2
1.4. Hypothesen zur Primärwirkung von Phytochrom	3
1.5. Problemstellung	3
2. Material und Methoden	5
2.1. Lichtquellen	5
2.2. Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit Phytochrom	5
2.3. Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration; Reinheitskriterien	6
2.3.1. Bestimmung von $\Delta(\Delta E)$	6
2.3.2. Phytochrom-Einheiten	7
2.3.3. Proteinkonzentration	7
2.3.4. Spezifische Aktivität und Reinheitsindex	7
2.3.5. Anreicherung	8
2.3.6. CaCO_3 -Technik zur Messung verdünnter und stark streuender Lösungen	8
2.4. Geräte	9
2.4.1. Spektralphotometer	9
2.4.2. Belichtungseinrichtung zur Phytochrombestimmung	9
2.4.3. Zentrifugen	11
2.4.4. Durchflußphotometer und Fraktionssammler	11
2.5. Aufzucht und Ernte der Keimlinge	11
2.5.1. Kürbis	11
2.5.2. Hafer	12
2.5.3. Mais	12
2.6. Gewinnung von C-Phycocyanin und C-Phycocerythrin	12
2.7. Durchführung der Spektralmessungen	13
2.8. Chromsäure- und Ammoniakabbau, Trennung und Nachweis der Abbauprodukte	13
2.8.1. Nicht-hydrolytischer Chromsäureabbau von Phytochrom	13
2.8.2. Hydrolytischer Chromsäureabbau	14
2.8.3. Ammoniakabbau	14
2.8.4. Vergleichssubstanzen	14
2.8.5. Trennung und Nachweis der Abbauprodukte	14

3. Isolierung, Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung von Phytochrom in löslicher Form	15
3.1. Einleitung und Zweck der Versuche	15
3.2. Auswahl des Pflanzenmaterials	16
3.3. Extraktion, Herstellung eines Rohextraktes	16
3.4. Versuche zur Vorreinigung sowie zur Konzentrierung des Rohextraktes	19
3.5. Reinigung an Calciumphosphatgelen	21
3.6. Konzentrieren durch Ammoniumsulfatfällung	27
3.7. Sephadex-Gelfiltration	29
3.8. DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher-Chromatographie	31
3.9. Zusammenstellung der Reinigungsschritte und Ergebnisse bei der Isolierung von Phytochrom in großem Maßstab	31
3.10. Molekulargewichtsbestimmung	37
3.11. Diskussion	39
4. Struktur der Phytochrom-Chromophore	43
4.1. Einleitung	43
4.2. Spektralmessungen der Phytochrom-Chromophore und anderer Gallenfarbstoffe	45
4.2.1. P_R in Guanidiniumchlorid	45
4.2.2. Phycocyanin in Guanidiniumchlorid	47
4.2.3. P_{FR} in Guanidiniumchlorid	49
4.2.4. Phototransformation des P_{FR} -Chromophors	50
4.2.5. Spektrophotometrische Titration von Phytochrom und Phycocyanin (pK-Werte)	50
4.2.6. Chemische Veränderung der Phytochrom- und Phycocyanin-Chromophore bei Zusatz von Oxydations- und Reduktionsmitteln	53
4.2.7. Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf Phycocyanin	55
4.2.8. Spektren von anderen Gallenfarbstoffen in Guanidiniumchloridlösung und ihre Veränderung bei Zusatz von Oxydations- und Reduktionsmitteln	56
4.3. Strukturaufklärung des Phytochrom-Chromophors mittels Chromsäure- und Ammoniakabbau	58

4.4. Diskussion der Ergebnisse	61
4.4.1. Folgerungen aus den Spektralmessungen für die Struktur der Phytochrom-Chromophore	61
4.4.2. Folgerungen aus den Abbauversuchen an Phyto- chrom für die Chromophorstruktur und seine Bindung an das Protein	72
5. Untersuchungen zur Bindung von Phytochrom an Zellpartikel	76
5.1. Überblick über bisherige Untersuchungen zur Partikel- bindung des Phytochroms und seine Lokalisierung in der Zelle	76
5.2. in-vitro-Bindung von Phytochrom an eine partikuläre Zellfraktion	77
5.2.1. Kürbis	77
5.2.2. Hafer	79
5.2.3. Mais	83
5.3. in-vivo-Partikelbindung von Phytochrom	84
5.3.1. Kürbis	84
5.3.2. Versuche mit Hafer	84
5.4. Anwendung der P_{FR} -Partikelbindung zur Isolierung und Reinigung von Phytochrom	95
5.4.1. Puffermenge zum Resuspendieren des gebundenen Phytochroms	95
5.4.2. Reinigung und wiederholte Partikelbindung des Phytochroms	97
5.4.3. Hydroxylapatit-Adsorption und Desorption	97
5.4.4. Ammoniumsulfatfällung	97
5.5. Diskussion	99
6. Zusammenfassung	106
7. Literaturverzeichnis	109

Abkürzungen

P: Phytochrom

P_R: rot- (660 nm-) absorbierende Form von Phytochrom

P_{FR}: dunkelrot- (730 nm-) absorbierende Form von Phytochrom

HR: Hellrotlicht der Wellenlänge 660 nm

DR: Dunkelrotlicht der Wellenlänge 730 nm

E: Extinktion

ΔE, Δ(ΔE): siehe Kap. 2.3., S. 6 ff.

O,5 KS, 20 KS, usw.: Überstand (supernatant) nach Zentrifugation bei 500 g, 20.000 g, usw.

O,5 KP, 20 KP, usw.: Sediment (pellet) nach Zentrifugation bei 500 g, 20.000 g, usw.

RE, AÜ1, AÜ2, ASF-U2, usw.: siehe Tab. 7, S. 32 ff.

MOPS: Morpholinopropansulfonsäure

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

EDTA: Äthylendiaminotetraessigsäure, Na₄-Salz

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Lichteffekte

Die Entwicklung und das Aussehen einer Pflanze werden außer durch die genetische Information in großem Umfang durch Außenfaktoren beeinflusst. Unter diesen Außenfaktoren ist das Licht besonders wirksam. Es ist sowohl Energiequelle für die Photosynthese in grünen Pflanzen als auch auslösender Faktor für Phototropismus, Photoperiodismus und Photomorphosen der Pflanzen. Gemeinsam ist den letzten drei Erscheinungen, daß sie Licht lediglich in sehr geringen Mengen benötigen und daß Licht als "Schalter" für die Auslösung oder auch Aufhebung dieser Effekte wirkt. Der Einfachheit halber sollen sie im folgenden unter "Photomorphosen" im weiteren Sinne zusammengefaßt werden.

1.2. Phytochrom-Entdeckung und Isolierungsversuche

Schon sehr früh war bekannt, daß die Wellenlänge des einestrahlten Lichtes einen Einfluß auf die Morphogenese hat (51,52) und daß Licht, speziell hellrotes und dunkelrotes Licht, nur in geringen Dosen zur Auslösung von Effekten benötigt wird (28). Im Jahre 1935 entdeckten FLINT und McALISTER (30), daß die lichtabhängige Keimung von Salatsamen durch Rotlicht im Wellenlängenbereich von 580 bis 700nm gefördert und durch Dunkelrotlicht zwischen 700 und 800nm gehemmt wird. Diese Versuche wurden von BORTHWICK und Mitarbeitern wiederholt und quantitativ ausgewertet (9,10). Sie bestätigten dabei, daß die Samenkeimung nur sehr geringe Mengen an Lichtenergie erfordert und durch kurze Bestrahlung mit Rotlicht ($\lambda_{\text{Max}} = 660\text{nm}$) gefördert bzw. durch Dunkelrotlicht ($\lambda_{\text{Max}} = 730\text{nm}$) gehemmt wird, wobei die endgültige Reaktion durch die Art der letzten Belichtung entschieden wird.

Ähnliche Wirkungsspektren wie sie von BORTHWICK et al. (9) für die Samenkeimung erhalten wurden, und die Photoreversibilität des Effektes wurden in der folgenden Zeit in vielen anderen

Fällen nachgewiesen, so z.B. bei der photoperiodischen Kontrolle des Blühens, bei der Regulation von Blatt- und Stengelwachstum und bei der Biosynthese verschiedener Pigmente (Zusammenfassung in Lit. 35).

Diese Ergebnisse führten zu der Voraussage, daß alle hellrot-dunkelrot reversiblen photomorphogenetischen Prozesse den gleichen Photorezeptor haben (10). Dieser Photorezeptor sollte in zwei photoreversiblen Formen existieren, nämlich in der P_R -Form, die maximal bei 660nm absorbiert, und in der bei 730nm absorbierenden P_{FR} -Form, wobei die P_{FR} -Form für die Auslösung der Photomorphosen verantwortlich ist.



Die geschilderte Hypothese wurde 1959 von BUTLER et al. (19) durch die spektralphotometrische Entdeckung eines Pigments mit den geforderten Eigenschaften bestätigt. Dieses später Phytochrom genannte Pigment konnte dann aus etiolierten Pflanzen isoliert und angereichert werden (19). Die fortgesetzten Bemühungen vieler Arbeitsgruppen führten in den folgenden Jahren mit unterschiedlichem Erfolg zur Ausarbeitung mehrerer Isolierungs- und Reinigungsmethoden für Phytochrom, jedoch waren alle zu Beginn dieser Arbeit bekannten Verfahren sehr zeitaufwendig (vgl. Kap. 3.1.).

1.3. Phytochrom, ein Chromoproteid

In den 16 Jahren seit dem ersten direkten Nachweis und der Isolierung des Phytochroms konnten viele seiner Eigenschaften genau untersucht und zum Teil geklärt werden. So konnte gezeigt werden, daß Phytochrom ein Chromoproteid ist (119), zusammengesetzt aus einem Chromophor und dem fest damit verbundenen Apoprotein. Als farbgebende Gruppe wurde auf Grund der Wirkungsspektren schon 1950 (11) ein Gallenfarbstoff vermutet und später von SIEGELMAN et al. (121) sowie von RÜDIGER und CORRELL (109) in groben Zügen nachgewiesen (vgl. Kap. 4.1.).

1.4. Hypothesen zur Primärwirkung von Phytochrom

Die Frage nach der durch Phytochrom ausgelösten Primärreaktion war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen, die inzwischen zu mehreren Modellen für die vielfältige Wirkung des Phytochroms führten. Die auf Grund der Proteinnatur zunächst angenommene Enzymeigenschaft von Phytochrom (8,46) war schon bald wegen zu geringer Übereinstimmung der " P_{PR} -Enzym"-Hypothese mit den gefundenen Ergebnissen unwahrscheinlich geworden (35). Das von MOHR (73,75) erarbeitete Modell der "differentiellen Genaktivierung"; das Phytochrom als spezifischen Regulator für die Genaktivität beschreibt, ist dagegen imstande, eine Reihe von Phytochrom-induzierten Photomorphosen, vor allem die Langzeitphänomene, gut zu erklären.

Die Beobachtung, daß eine Reihe von Phytochrom-gesteuerten Effekten mit Änderungen von Membraneigenschaften verbunden sind (vgl. Kap. 5.1.) sowie Untersuchungen zur Lokalisierung von Phytochrom (vgl. Kap. 5.1.) führten zu der Hypothese, daß Phytochrom die Konformation spezifischer Membranen und ihre Permeabilität steuert (45,124). Ein von MARMÉ, QUAIL und anderen Autoren ausgearbeitetes Modell (6,68,95,96) zur Erklärung der Phytochromwirkung, das auf Versuchen zur Partikelbindung von Phytochrom bei Kürbiskeimlingen beruht, postuliert deshalb die lichtinduzierte Bindung des Phytochroms an Membranen und beschreibt seine Wirkung auf Membranebene (Membranbindungsmodell). Allerdings wurde der Aussagewert dieser Versuche inzwischen verschiedentlich angezweifelt (93,94).

1.5. Problemstellung

Die bei der Phototransformation von Phytochrom im Chromophor ablaufenden chemischen Reaktionen sind noch vollständig unbekannt. Deshalb sollte versucht werden, die Struktur des Phytochrom-Chromophors aufzuklären, um daraus Rückschlüsse auf mögliche durch Licht induzierte Primärreaktionen des Phytochrom-Moleküls ziehen zu können.

* in letzter Zeit modifiziert und als Änderung der "Genexpression" bezeichnet (Vortrag im Botan. Institut, Universität München, Januar 1976)

Diese Versuche mußten mit einem ausreichend reinen Phytochrompräparat durchgeführt werden, zu dessen Gewinnung ein möglichst einfaches Verfahren ausgearbeitet werden sollte.

Durch Versuche zur Partikelbindung des Phytochroms bei Hafer und Mais sollte versucht werden, Aussagen über die Allgemeingültigkeit des Membranbindungsmodells zu erhalten. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob sich diese Methode zur Isolierung von Phytochrom im großen Maßstab eignet.

2. Material und Methoden

2.1. Lichtquellen

2.1.1. Grünes Sicherheitslicht

Sämtliche Arbeiten mit Phytochrom wurden, soweit nicht ausdrücklich anders erwähnt, unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt. Dies ist nötig, um eine Umwandlung in die durch Belichtung entstehende P_{FR} -Form, die wesentlich instabiler als die P_R -Form ist (20,77), zu vermeiden.

Die von Leuchtstoffröhren (Philips TL 40W/17) emittierte Strahlung wurde dazu durch eine dreiteilige Plexiglaskombination in der Anordnung grün-orange-grün (Fa. Röhm und Haas GmbH, Darmstadt, Nr.478 orange, Nr.701 grün) gefiltert (vgl. Lit.12).

2.1.2. Hellrotfeld

Das von Leuchtstoffröhren (Philips TL D 15W/34) emittierte Licht geht durch rotes Plexiglas (2mm, Nr.501, Röhm und Haas, Darmstadt).

2.1.3. Dunkelrotfeld

Wie 2.1.2., jedoch dreiteilige Plexiglaskombination in der Anordnung blau-rot-blau (Nr.627 blau, Nr.501 rot).

2.2. Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit Phytochrom

a) Temperatur

Phytochromlösungen wurden zur Vermeidung von Verlusten an nativem Pigment entweder in einem Eisbad oder in einem Kühlraum bei ca. $+4^{\circ}\text{C}$ (Säulenchromatographie) gehalten. Zur Aufbewahrung von Keimlingen und Lösungen wurden diese bei -20°C im Tiefkühlschrank eingefroren.

b) pH-Wert

Alle Phytochromlösungen wurden stets zwischen pH6 und 8 gehalten, da das Pigment nur in diesem pH-Bereich stabil ist (60).

c) Oxydation

In den Pflanzen enthaltene Oxydasen müssen gehemmt werden. Statt Cystein (36) oder 2-Mercaptoäthanol (59,98,119) wurde in der vorliegenden Arbeit das Reduktionsmittel Natriumsulfit benützt, das sich in einer Konzentration von 0,01M als gleichwertig mit 2-Mercaptoäthanol erwies (99).

d) Denaturierende Agentien

Denaturierende Agentien (z.B. organische Lösungsmittel, Schwermetalle) wurden ferngehalten, und es wurde vermieden, daß Denaturierung durch Schäumen der Lösungen und Extrakte eintrat.

2.3. Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration;
Reinheitskriterien

2.3.1. Bestimmung von $\Delta(\Delta E)$

Die Eigenschaft des Phytochroms, in zwei photoreversiblen Formen vorzukommen, ist Grundlage der einzigen bis heute existierenden quantitativen Bestimmung von Phytochrom (18,19).

Die Bestimmung der Phytochrom-Konzentration erfolgt durch Messung der Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_{660} - E_{730}$ jeweils nach Belichtung der Meßlösung mit Rot (660nm)- bzw. Dunkelrot (730nm)-Licht. Die Differenz der so erhaltenen Werte ergibt als Maß für die Phytochrom-Konzentration den Wert $\Delta(\Delta E)$. Alle spektralphotometrischen Meßwerte wurden in 1cm-Küvetten bestimmt. Es gelten folgende Beziehungen (vgl. Abb.1):

$$\text{Phytochrom-Konzentration} \hat{=} \Delta(\Delta E) = E_{730} - E_{660}$$

$$\Delta E_{730} = [E_{660} - E_{730}] \text{ nach Dunkelrot (730nm)-Belichtung}$$

$$\Delta E_{660} = [E_{660} - E_{730}] \text{ nach Rot (660nm)-Belichtung}$$

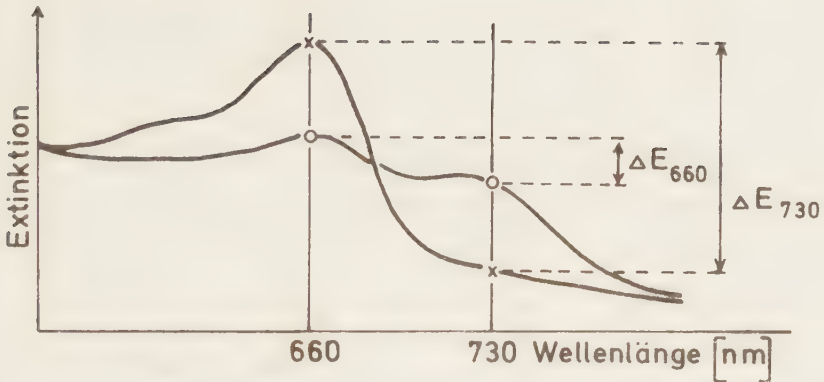


Abb.1: Bestimmung der Phytochrom-Konzentration $\Delta(\Delta E)$

2.3.2. Phytochrom-Einheiten

Die Gesamtmenge an Phytochrom in einer Lösung erhält man durch Multiplikation der Phytochrom-Konzentration $\Delta(\Delta E)$ mit dem Volumen der Lösung. Der so erhaltene Wert gibt die Anzahl von "Phytochrom-Einheiten" in der Lösung an:

$$\text{Phytochrom-Einheiten} = \Delta(\Delta E) \times \text{Volumen [ml]}$$

2.3.3. Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen wurde die von LAYNE (63) ausgearbeitete spektrophotometrische Methode angewandt. Sie liefert, vor allem in Lösungen mit Eigenfärbung, zwar nur Näherungswerte, ist aber wegen ihrer Einfachheit für Routinemessungen gut geeignet. Nach Messung der Extinktion einer Lösung bei 280nm und 260nm erhält man:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}$$

2.3.4. Spezifische Aktivität und Reinheitsindex

Bezieht man die Konzentration ("Aktivität") an Phytochrom $\Delta(\Delta E)$

auf die Proteinkonzentration $[\text{mg/ml}]$ in einem Extrakt, so erhält man als Maß für die Reinheit einer Phytochromlösung die spezifische Aktivität. Dieser Wert sollte im Verlauf einer Reinigung ansteigen.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta(\Delta E)}{\text{Proteinkonzentration } [\text{mg/ml}]}$$

Ein anderes Maß für die Reinheit ist der Reinheitsindex. Er berechnet sich für Proben in der P_R -Form nach:

$$\text{Reinheitsindex} = E_{280} : E_{660} \quad (\text{bzw. } E_{665}, \text{ Lit. 98})$$

In Lösungen mit geringer Reinheit erhält man auf diese Weise aber unrealistische Werte, da E_{660} hier durch Fremdsubstanzen und Trübungen sehr hoch sein kann, ohne daß dies auf Absorption durch Phytochrom beruht.

Hier hilft die Tatsache, daß in reinen P_R -Lösungen $E_{660} \approx \Delta(\Delta E)$ ist. Somit kann der Reinheitsindex auch für unreine Proben annähernd berechnet werden:

$$\text{Reinheitsindex} \approx E_{280} : \Delta(\Delta E)$$

Im Verlauf der Reinigung wird der Wert kleiner. In reinem Phytochrom liegt er bei 1 (0,8 für niedermolekulares Phytochrom aus Hafer, Lit. 98, bzw. 1,3 für Phytochrom aus Roggen).

2.3.5. Anreicherung

Die Anreicherung wird definiert nach:

$$\text{Anreicherung} = \frac{\text{Spez. Aktivität nach Reinigungsschritt}}{\text{Spez. Aktivität vor Reinigungsschritt}}$$

Eine dreifache Anreicherung besagt z.B., daß bei dem Reinigungsschritt 2/3 Fremdprotein entfernt wurden.

2.3.6. CaCO_3 -Technik zur Messung verdünnter und stark streuender Lösungen

Extrakte aus Kürbiskeimlingen sowie einige Kontrollwerte mit Hafer- und Maiskeimlingen wurden mit Hilfe der CaCO_3 -Technik gemessen. Die von BUTLER (15) ausgearbeitete Methode erlaubt es, die Extinktion von stark streuenden und sehr verdünnten Lösungen zu bestimmen. Dazu wird die Meßlösung in einer Küvette mit CaCO_3

zu einem homogenen Brei vermischt. Dadurch wird bewirkt, daß die von der zu messenden Lösung stammende Streuung des Meßstrahls gering ist im Vergleich zur stets gleichbleibenden Streuung durch das CaCO_3 . Durch die Vervielfachung des Lichtweges wird ein ca. 20-fach größeres Meßsignal (E) erreicht. Die Anwendung dieser Technik beschränkt sich auf Spektralphotometer, deren Photomultiplier direkt hinter der Küvette plaziert ist. Zur Durchführung der Messung: siehe Lit. 70.

2.4. Geräte

2.4.1. Spektralphotometer

Alle Spektren wurden mit dem hochauflösenden 2-Strahl-Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator (Fa. Zeiss, Oberkochen) registriert.

Ebenso wurden die Bestimmungen der Phytochromkonzentration $\Delta(\Delta E)$ (Ausnahmen: CaCO_3 -Technik) und der Proteinkonzentration mit diesem Gerät vorgenommen.

Die Messungen mit Hilfe der CaCO_3 -Technik wurden mit einem modifizierten Ratiospect-2-Wellenlängen-Differenzspektralphotometer (67) oder mit einem Perkin-Elmer 356 - Spektralphotometer (113) durchgeführt.

Küvetten und Küvettenraum der Spektralphotometer wurden während der Messungen auf $+4^{\circ}\text{C}$ gehalten.

2.4.2. Belichtungseinrichtung zur Phytochrombestimmung

Zur Messung der Phytochromkonzentration $\Delta(\Delta E)$ in Lösungen wurden diese mit Hellrot- bzw. Dunkelrotlicht möglichst vollständig in P_{FR} bzw. P_R umgewandelt. Dies geschah mit Hilfe einer Beleuchtungseinrichtung (Abb.2), die es erlaubte, die Lösungen im Küvettenraum saturierend zu bestrahlen. Hauptbestandteile dieser Apparatur waren als Lichtquelle Bauteile eines Projektors der Fa. Leitz, Wetzlar (Typ Prado, 12 V - Halogenlampe) sowie 2 Interferenzfilter (Fa. Seavom, Argenteuil, Frankreich) mit den Wellenlängen 660,3 nm (Halbwertsbreite HW = 12,8 nm, maximale Transmission $T_{\text{Max}} = 78\%$) und 728,3 nm (HW = 14 nm, $T_{\text{Max}} = 75\%$).

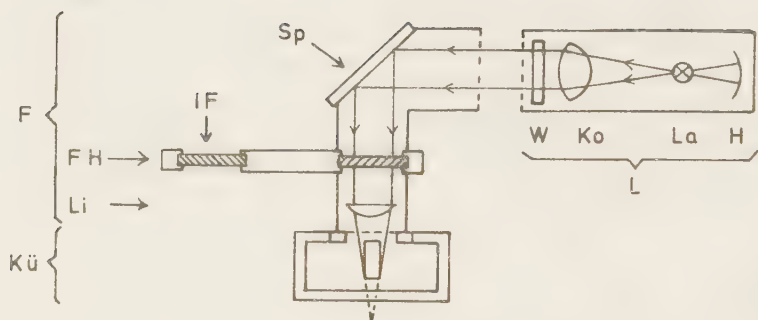


Abb. 2: Beleuchtungseinrichtung zur Messung von $\Delta(\Delta E)$

L: Beleuchtungseinheit mit La: 12 V - Halogenlampe, H: Hohlspiegel, Ko: Kondensorlinse, W: Wärmeschutzfilter; F: Filtereinheit mit Sp: Umlenkspiegel, FH: Filterhalter, IF: 2 Interferenzfilter, L: Konvexlinse; Kü: Küvettenraum des DMR 22 mit Küvettenhalter und 1 cm - Küvette

Ein Netzgerät sorgte für konstante Lampenspannung und Steuerung der Belichtungszeiten. Die zur vollen Phototransformation von Phytochrom ausreichenden Belichtungszeiten sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Belichtungszeiten zur Phototransformation von Phytochrom in Abhängigkeit von seiner Konzentration

$\Delta(\Delta E)$	Belichtung bei	
	660 nm	730 nm
< 0,1000	30 sec	1 min
> 0,1000	1 min	2 min
> 0,5000	2 min	4 min

2.4.3. Zentrifugen

Niederschläge wurden hauptsächlich in der Kühlzentrifuge G 50 K (Fa. WKF, Brandau) abzentrifugiert. Dabei wurden mit dem Rotor 6 x 500ml bei 10.000 Upm maximal 18.000 g erreicht, mit dem Rotor 6 x 250 ml wurden bei 16.000 Upm 40.000 g und bei 11.500 Upm 20.000 g sowie mit dem Rotor 8 x 38 ml wurden bei 20.000 Upm 40.000 g, bei 14.000 Upm 20.000 g und bei 2.000 Upm 500 g erreicht. Daneben kam die Sorvall - Kühlzentrifuge RC 2-B mit dem Rotor SS 34 (50.000 g bei 20.000 Upm, 20.000 g bei 13.000 Upm, 10.000 g bei 9.000 Upm und 500 g bei 2.000 Upm) sowie eine Beckman-Ultrazentrifuge mit Rotor TI 50 (100.000 g bei 35.000 Upm) bei Versuchen zur Partikelbindung des Phytochroms zum Einsatz.

Zur Sedimentation von Proteinniederschlägen beim Chromsäureabbau (Kap. 2.8.) genügte die Zentrifugation in einer Tischzentrifuge der Fa. Christ (Osterrode/Harz) Typ Junior I bei Stufe 10.

2.4.4. Durchflußphotometer und Fraktionssammler

Die Transmission von Säuleneluaten wurde bei 280 nm mit dem Durchflußphotometer Uvicord II der Fa. LKB (Bromma/Schweden) gemessen und gleichzeitig von einem Schreiber, Typ WPS 1 der Fa. Colora (Lorch), registriert.

Das Eluat wurde in dem Fraktionssammler Mini Escargot der Fa. Gilson gesammelt.

2.5. Aufzucht und Ernte der Keimlinge

2.5.1. Kürbis

Kürbissamen (Cucurbita pepo L., Sorte Black beauty) wurden auf nassem Filterpapier ausgelegt und in lichtdichten Plastikboxen bei 25°C zum Keimen gebracht (vgl. Lit. 70). Nach 6 Tagen wurden die Hypokotylhaken (1 cm Länge) in grünem Sicherheitslicht abgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

2.5.2. Hafer

3 l Vermiculith (Körnung Nr. 4) wurden in Plastikwannen (60 x 50 cm) ausgebreitet und mit 2 l Wasser getränkt. 200 g Hafer (*Avena sativa* L., Sorte Delphin ZS, gebeizt) wurde gleichmäßig darauf ausgesät, mit einer Plastik-Lochplatte (Durchmesser der Löcher: 3 mm) abgedeckt und in einem Brutschrank (1170 l, Fa. Hofmann, Nellingen/F.) bei 27-28°C und maximaler Luftfeuchtigkeit im Dunkeln zum Keimen gebracht. Nach 4 Tagen wurden die Keimlinge unter grünem Sicherheitslicht geerntet, indem sie mit Hilfe einer Spachtel über der Lochplatte abgeschnitten wurden. Die so erhaltenen Keimlinge (etwa 200 g pro Platte) waren 3-4 cm lang.

Je nach Art der Versuche wurden die Keimlinge nun entweder sofort unter grünem Sicherheitslicht oder nach Bestrahlung mit Rotlicht (Versuche zur Partikelbindung von Phytochrom, vgl. Kap. 5) aufgearbeitet oder aber bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt. Im Gegensatz zu den Angaben von KROES (59), der aus gefrorenen und wieder-aufgetauten Keimlingen ca. 40% weniger Phytochrom als aus frischen extrahierte, wurde hier festgestellt, daß die Keimlinge mehrere Monate ohne wesentlichen Phytochromverlust haltbar sind. Auf wassergetränktem Zellstoff (vgl. Lit. 119) ging der Hafer nur sehr ungleichmäßig auf und wuchs dementsprechend auch nicht gleichmäßig.

2.5.3. Mais

Mais (*Zea mays* L.) wurde in gleicher Weise wie der Hafer auf Vermiculith ausgesät und geerntet. Die von einer 60 x 50 cm grossen Platte geerntete Menge an Keimlingen betrug jedoch nur etwa 100 g (gegenüber 200 g beim Hafer).

2.6. Gewinnung von C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin

C-Phycocyanin und C-Phycoerythrin wurden aus einem Extrakt aus *Pseudanabaena* sp. isoliert*, in dem Phycocyanin gegenüber Phycoerythrin angereichert war (Nebenfraktionen nach Sephadex G-100 - Chromatographie eines durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierten Rohextraktes (vgl. Lit. 110a). C-Phycocyanin wurde durch Ammoniumsulfatfällung bei 50%, C-Phycoerythrin bei 50-80% Sättigung

* Die Lösung wurde mir freundlicherweise von Herrn G. Muckle zur Verfügung gestellt.

weiter angereichert und konzentriert.

Durch Sephadex-G-200-Chromatographie wurden die beiden Konzentrate weiter gereinigt, wobei reines C-Phycocyanin ($\lambda_{\text{Max}} = 618\text{nm}$, Schulter 600 nm) in den ersten, reines C-Phycoerythrin ($\lambda_{\text{Max}} = 563\text{ nm}$, Schulter 540 nm) in den letzten gefärbten Fraktionen eluiert wurde.

2.7. Durchführung der Spektralmessungen

Die Spektralmessungen von Biliproteiden und Gallenfarbstoffen in Gegenwart von Guanidiniumchlorid wurden in Thunberg-Küvetten unter Stickstoff mit dem Zeiss-Spektralphotometer DMR 22 (Kap. 2.4.1.) durchgeführt.

1,5 ml 8 M Guanidiniumchloridlösung (+ 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl, 0,01 M EDTA), die mit 1 M KOH oder 1 M HCl auf pH-Werte zwischen 0,5 und 12,5 gebracht worden war, sowie gegebenenfalls Oxydations- oder Reduktionsmittel wurden in die Thunberg-Küvette gegeben, 0,5 ml des Farbstoffs, dessen Spektrum gemessen werden sollte, in den Seitenarm. Nach wiederholtem Evakuieren der Küvette und Spülen mit Stickstoff wurden die Lösungen unter Stickstoff gemischt und sofort vermessen.

Phytochromlösungen wurden im Seitenarm mit der in Kap. 2.4.2. beschriebenen Beleuchtungsapparatur saturierend bestrahlt und dann unter grünem Sicherheitslicht mit der Guanidiniumchloridlösung gemischt.

Der pH-Wert der Mischungen wurde unmittelbar nach den Spektralmessungen mit einem pH-Meter (Fa. Knick) gemessen.

2.8. Chromsäure- und Ammoniakabbauten, Trennung und Nachweis der Abbauprodukte

2.8.1. Nicht-hydrolytischer Chromsäureabbau von Phytochrom (vgl. Lit. 105, 111)

Ausgangsprodukt waren nach Tab. 7 (Kap. 3.9.) gereinigte und lyophilisierte Phytochromfraktionen. Das Lyophilisat (ca. 0,8-1,5 Phytochrom-Einheiten) wurde in 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 2 ml Chromsäurelösung (1 g CrO_3 werden in 100 ml 2 N H_2SO_4 gelöst) versetzt. Der ausflockende Proteinniederschlag wurde mit einem Spatel zerkleinert und nach 1 Stunde in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit je 0,5 ml

Essigsäureäthylester dreimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 0,5 ml Wasser gewaschen, unter Stickstoff eingedampft und in 0,1 ml Essigester aufgenommen.

2.8.2. Hydrolytischer Chromsäureabbau (vgl. Lit. 105,111)

Der nach nicht-hydrolytischem Chromsäureabbau (siehe oben) erhaltene Proteinniederschlag wurde mit 1 ml Chromsäurelösung versetzt, digeriert und eine Stunde auf 110° C erwärmt. Dann wurde abzentrifugiert und der Überstand wie oben mit Essigester extrahiert

2.8.3. Ammoniakabbau (vgl. Lit. 114,115)

Der nach nicht-hydrolytischem Chromsäureabbau (siehe oben) erhaltene Proteinniederschlag wurde mit 1 ml 2 N NH_3 versetzt, digeriert und 1 Stunde entweder bei Raumtemperatur oder bei 110° C gehalten. Dann wurde abzentrifugiert, der Überstand wurde unter Eiskühlung mit 4 N H_2SO_4 angesäuert und wie oben mit Essigester extrahiert.

2.8.4. Vergleichssubstanzen

Bilirubin wurde nach Kap. 2.8.1. abgebaut, erhalten wurde Methylvinyl-maleinimid (VI, vgl. S.58) und Hämatinsäureimid (VIII). Methyl-äthyliden-succinimid (V) wurde nach Lit. 115 synthetisiert, Isatin war ein Produkt der Fa. Merck, Darmstadt (Nr. 4734).

2.8.5. Trennung und Nachweis der Abbauprodukte

Die Auftrennung der aus den Chromsäure- und Ammoniakabbauten erhaltenen Produkte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (HPTLC Fertigplatten Kieselgel 60 F 254, Fa. Merck, Nr. 5628) in Tetrachlorkohlenstoff/Essigester/Cyclohexan (4 : 4 : 1).

Auf der fertig entwickelten Dünnschichtplatte wurden die Produkte zunächst unter UV-Licht betrachtet und dann mittels der Chlor/Benzidin-Reaktion (105) sichtbar gemacht.

3. Isolierung, Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung von Phytochrom in löslicher Form

3.1. Einleitung und Zweck der Versuche

Untersuchungen über die Struktur des Phytochroms und viele seiner Eigenschaften lassen sich nur mit einem gereinigten Pigment durchführen. Es sollte sicher sein, daß Fremdstoffe, die noch in der Lösung enthalten sind, keinen Einfluß auf die zu untersuchenden Eigenschaften des Phytochroms haben. Seitdem es im Jahre 1959 zum erstenmal gelang, Phytochrom zu isolieren und teilweise zu reinigen (19), wurde in vielen Laboratorien versucht, eine vollständige Reinigung des Phytochroms unter Beibehaltung seiner nativen Struktur zu erreichen. Dabei wurden die üblichen Methoden zur Proteinisolierung angewendet und vielfältig variiert. Alle Verfahren bestehen aus einer Kombination von chromatographischen Reinigungsschritten, angefangen von der Gelfiltration bis zur Ionenaustauscherchromatographie, und Konzentrierungsschritten, z.B. Ammoniumsulfatfällungen oder Ultrafiltrationen. Einige Autoren verwenden auch eine Elektrophorese oder eine isoelektrische Fokussierung zur Reinigung.

Diese Methoden sind jedoch sehr aufwendig und zeitraubend, und sie werden noch dadurch erschwert, daß Phytochrom nur in sehr geringen Mengen in Pflanzen enthalten ist, in seinen Extrakten instabil ist und rasch an Aktivität verliert. Eine vollständige Reinigung des Phytochroms ist einer Arbeitsgruppe um BRIGGS (98) erst im Jahre 1973 gelungen. Dieses Verfahren basiert auf einer von SIEGELMAN et al. (72,119) entwickelten Methode und umfaßt vier säulenchromatographische Verfahren (Brushit-, DEAE-Cellulose- und CM-Sephadex-Ionenaustauscherchromatographie sowie Gelfiltrationen an Biogel P-150) zur Reinigung und Ammoniumsulfatfällungen zur Konzentrierung von Lösungen.

Den Nachteil dieses Verfahrens, nämlich das häufige Arbeiten mit großen Volumina, versuchte eine andere von KROES et al. (59,60) entwickelte Vorschrift zu umgehen, indem eine "batch"-Adsorption an Hydroxylapatit als kombinierte Reinigungs- und Konzentrierungsmethode eingeführt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von KROES (60) beschriebene Methode zur Grundlage der Isolierung und Reinigung gemacht. Da sich die dort angegebenen Ergebnisse nicht vollständig reproduzieren ließen, mußte das Verfahren variiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, daß alle Einzelschritte möglichst einfach durchzuführen waren.

3.2. Auswahl des Pflanzenmaterials

Phytochrom wird in der Regel nur aus etiolierten Pflanzen extrahiert, da eine Isolierung aus grünen Pflanzen aus mehreren Gründen ungeeignet ist:

- 1) Die aus grünen Pflanzen gewonnene Menge an Phytochrom beträgt nur Bruchteile (weniger als 5%) derjenigen aus etiolierten Pflanzen (61,119).
- 2) Ein Teil des in grünen Pflanzen enthaltenen Phytochroms scheint nur wenig löslich zu sein (35,57) und läßt sich daher nur mit besonderen Methoden extrahieren (vgl. Kap.5).
- 3) Das in grünen Pflanzen in großen Mengen enthaltene Chlorophyll stört sowohl die Bestimmung des Phytochromgehaltes in Extrakten (Absorption von Rotlicht, vgl. Lit. 19,61,117) als auch die Isolierung und Reinigung.

Als Pflanzenmaterial zur Extraktion von Phytochrom diene Hafer (*Avena sativa*), bei dem in eigenen Untersuchungen (vgl. Kap.2.5.) die besten Resultate bei der Aufzucht erzielt wurden und der auch von den meisten Arbeitsgruppen wegen seines hohen Gehaltes an Phytochrom bevorzugt wurde. Laut SIEGELMAN und FIRER (119) enthalten Haferkeimlinge mehr als doppelt so viel Pigment wie die anderen von ihnen untersuchten Pflanzen.

3.3. Extraktion, Herstellung eines Rohextrakts

Nach KROES (59) fällt die extrahierte Menge an Phytochrom und seine spezifische Aktivität in einem Extrakt mit steigender Molarität des Puffers ab. Günstige Ergebnisse erhielt er mit

einem 0,015 M Tris-Puffer (pH 10,3). Trotzdem wurde für Groß-extraktionen ein konzentrierter Puffer gewählt, damit auch mit einem geringen Volumen an Puffer bei der Extraktion der schwach sauren Keimlinge ein pH-Wert oberhalb 7,0 eingehalten werden konnte.

Das Verhältnis Puffer : Keimlinge hat auf die spezifische Aktivität eines Extraktes nur wenig Einfluß, die Menge an extrahiertem Phytochrom steigt jedoch bei Extraktion mit mehr Puffer an (59).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Keimlinge mit 0,1 M Tris-Puffer (pH 8,1) im Verhältnis 2:1 (Keimlingsgewicht in g : Puffervolumen in ml) extrahiert (vgl. Tab.7).

Nach Zentrifugation bei 40.000 g erhält man den Rohextrakt, der einen pH-Wert von etwa 7,2-7,5 hat. Die Ergebnisse von rund 100 Versuchen, bei denen Mengen von ca. 150 g bis zu 3,5 kg Keimlingen verarbeitet wurden, sind in Tab. 2 zusammengefaßt und mit Extraktionsverfahren aus der Literatur verglichen.

Tab.2: Vergleich der Ergebnisse eigener Extraktionsversuche mit Literaturangaben

	Jahr	Menge an Keiml.	$\Delta(\Delta E)$ $\times 10^4$	P-Ein- heiten	<u>P-Einheiten</u> <u>Keiml.-Gew.</u>	Spez.Akt. $\times 10^4$
diese Arbeit*	.	3,0 kg	123 (50-205)	44,2 (18-74)	14,7 (5,5-24,4)	5,15 (1,8-14,5)
BUTLER et al. (19)	1959	0,45 kg	40	2,36	5,2	6,4
SIEGELMAN und FIRER (119)	1964	1,5 kg	38	9,5	6,33	21
MUMFORD und JENNER (78)	1966	25 kg	?	240	9,6	?
KROES (58)	1968	?	24	37,4	?	16
KROES (59)	1970	25 kg	25-75	160-130	6,4-5,3	18-22
RICHTER (99)	1972	(~1 kg)	40	4,7	(~4,7)	1,9
RICE et al. (98)	1973	16,6 kg	70	199,5	12,02	3,44

* Werte in Klammern: Streubereich

Die Auswertung der eigenen Extraktionsversuche (Tab.2) ergab ein insgesamt sehr gutes Bild:

Trotz der relativ geringen Menge an Extraktionspuffer (Vol. : Gewicht = 1 : 2) und dem daraus resultierenden geringen Volumen im Extrakt wurde eine sehr hohe Ausbeute an Phytochrom erhalten. Mit einer Gesamtmenge von 14,7 Phytochrom-Einheiten je kg Keimlinge wurde sogar der höchste in der Literatur (98) beschriebene Wert etwas übertroffen. Auch die Phytochromkonzentration [$\Delta(\Delta E) = 0,0123$] liegt dementsprechend sehr hoch. Dies bedeutet, daß sowohl die gewählten Anzuchtbedingungen als auch die Extraktionsmethode (siehe Tab.7) optimal geeignet sind zur Gewinnung großer Mengen an Phytochrom. Allerdings sind die Schwankungen sehr stark, was im wesentlichen auf folgenden Ursachen beruht:

- a) Schwankungen im Phytochromgehalt und in der Wachstumsrate der Keimlinge je nach Dauer der Lagerung des Samens sowie durch Schwankungen der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit im Brutschrank;
- b) Abnahme des Phytochromgehaltes bei sehr langem Lagern von gefrorenen Keimlingen;
- c) Abnahme der Phytochrommenge

bei zu langsamem (Destruktion) oder zu schnellem (Denaturierung) Auftauen der Keimlinge;
durch Erwärmung während des Mixens;
durch ungenügendes Auspressen des Homogenats.

Die im Mittel erhaltene spezifische Aktivität von $5,15 \times 10^{-4}$ liegt zwar im Vergleich zu einigen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen nicht sehr hoch, jedoch wird auch hier der von RICE et al. (98) kürzlich erreichte Wert noch übertroffen. Der Grund für die relativ geringe spezifische Aktivität liegt in der hohen Proteinkonzentration im Extrakt (24 mg/ml), möglicherweise ist dieser Wert aber auch wegen der nur Näherungswerte liefernden spektrophotometrischen Methode (Kap. 2.3.3.) zu hoch.

3.4. Versuche zu einer Vorreinigung sowie zur Konzentrierung des Rohextrakts

a) Calciumchlorid-Zusatz

Zur Ausfällung von Pektinen und anderen Ca^{2+} -bindenden Substanzen wurde dem Rohextrakt oder dem nach dem Auspressen des Homogenats erhaltenen Filtrat CaCl_2 bis zu einer Konzentration von 10 mM zugesetzt (37,48,98).

Tab.3: CaCl_2 -Zusatz zum Filtrat nach Auspressen oder zum Rohextrakt.

Zusatz von 10 mM CaCl_2 zum Filtrat (nicht zentrifugierter Rohextrakt) oder zum Rohextrakt, 15 min rühren, 30 min zentrifugieren bei 40.000 g. Mittelwerte aus 6 (Filtrat) bzw. 9 (Rohextrakt) Versuchen.

	Filtrat		Rohextrakt	
	ohne CaCl_2 *	mit CaCl_2	ohne CaCl_2	mit CaCl_2
$\Delta(\Delta E)$	0,0114	0,0111	0,0125	0,0111
Ausbeute	100%	96,7%	100%	88,8%
Spez. Akt. $\times 10^4$	5,20	5,05	5,43	5,13
Anreicherung	1	0,97	1	0,94

* Messung nach Zentrifugation

Dadurch wurde zwar eine deutliche Verringerung im Anteil von hauptsächlich gelb gefärbten Verunreinigungen, jedoch keine Erhöhung der spezifischen Aktivität erreicht. Es wurden also im wesentlichen nur leicht lösliche, hauptsächlich niedermolekulare Stoffe abgetrennt, die auch auf späteren Reinigungsstufen leicht entfernt werden. Eine CaCl_2 -Zugabe zum Rohextrakt lohnt sich also nicht, zumal sie auch mit einem leichten Verlust an Phytochrom verbunden ist.

b) "Voradsorption" an Hydroxylapatit bei pH 7,8

Versuche zu einer "Voradsorption" von Fremdproteinen an Hydroxylapatit bei pH 7,8 (vgl. Lit. 99) brachten bei Verlusten von rund 5-10% Phytochrom zwar eine geringfügige Steigerung der Reinheit um 5-15%, jedoch ist der erreichte Effekt im Verhältnis zum Aufwand (Zeit und Material) nur sehr gering.

c) Konzentrieren mit trockenem Sephadex G-50

Einige Autoren haben eine Volumenverminderung des Rohextraktes durch Ultrafiltration (119), Gefriertrocknung (131), Ammoniumsulfatfällung (23) oder Wasserentzug durch trockenes Sephadex G-50-Pulver (59,135) vorgenommen.

Bei der Zugabe zu einem Extrakt quillt das Sephadex-Pulver stark auf und bindet erhebliche Mengen an Puffer. Im Gegensatz zu Wasser und anderen niedermolekularen Stoffen (Ausschlußgrenze von Sephadex G-50 für Proteine = 30.000 Dalton) dringt Phytochrom nicht in die Poren des Gels ein und kann daher zusammen mit überschüssigem Puffer abgesaugt werden (116).

Bei einem Reinigungsfaktor von 1,7 (Tab. 4) konnten hier wesentlich höhere Ausbeuten (ca. 89%) erreicht werden, als sie von KROES (Lit. 59: Ausbeute ~60-75% bei einem Reinigungsfaktor von 1,63) für die Konzentrierung von Rohextrakten angegeben wurden. Allerdings wurde dafür mit einer Volumenverminderung auf nur 44,7% (gegenüber 24,1%) vorliebgenommen. Mehrmaliges Konzentrieren auf diese Weise war zwar möglich, jedoch wurden die Verluste an Phytochrom dann größer.

Tab. 4: Konzentrieren mit trockenem Sephadex G-50;

10 g Sephadex G-50 (coarse) je 100 ml Rohextrakt, 10 min unter gelegentlichem Umrühren quellen lassen, absaugen des Breies und waschen mit 10 ml 0,02 M Tris-Puffer (pH 7,8).

	vorher	nachher
Volumen*	100 ml	44,7 ml
$\Delta(AE)^*$	0,0126	0,0253
Gesamt-Aktivität*	100%	89,4%
Spez. Aktivität**	$4,49 \times 10^{-4}$	$7,64 \times 10^{-4}$
Anreicherung**	1	1,70

* Mittelwerte aus 11 Versuchen

** Mittelwerte aus 4 Versuchen

Trotz der guten Ergebnisse eignet sich diese Methode nicht zu einer regelmäßigen Anwendung, da das Sephadex-Pulver wegen seiner hohen Kosten stets unter großem Zeitaufwand regeneriert werden muß.

Eine Ammoniumsulfatfällung auf dieser frühen Stufe der Phytochromreinigung ist mit ziemlich hohen Verlusten verbunden (59,23,120) und wurde ebenso wie die sehr lange dauernde Ultrafiltration und Gefriertrocknung nicht angewendet.

Statt dessen wurde der Rohextrakt durch Adsorption und Desorption an Hydroxylapatit in einem Schritt gereinigt und konzentriert.

3.5. Reinigung an Calciumphosphatgelen

a) Brushit

Calciumphosphatgele können in zwei Formen zur Reinigung von Phytochrom benutzt werden: entweder als Brushit $[\text{CaHPO}_4]$ oder als Hydroxylapatit $[\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$. Bei der Herstellung aus CaCl_2 und K_2HPO_4 entsteht zunächst Calciumhydrogenphosphat (Brushit), das aber noch nicht über gute Adsorptionseigenschaften verfügt und durch verschiedene Prozeduren erst aktiviert werden muß (98,107,122). Aber auch dann verändert Brushit sein Verhalten bezüglich der Adsorptionsfähigkeit für Phytochrom in unkontrollierbarer Weise (59). Deshalb ist es verständlich, daß es fast ebenso viele Arbeitsvorschriften für die Brushit-Chromatographie von Phytochrom gibt wie Autoren, die darüber berichten (vgl. Lit. 13 und 107).

Bei einigen Versuchen, die mit Brushit, hergestellt nach der Methode von MILLER et al. (72), durchgeführt wurden, konnten keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Selbst eine Brushit-Menge von ~ 2 l pro kg Keimlinge, die in eine Säule gefüllt war, reichte in der Regel nicht zur vollständigen Adsorption von Phytochrom aus.

b) Hydroxylapatit-Suspension

Wegen der wenig konstanten Eigenschaften des Brushits wurde der stabilere Hydroxylapatit zur Reinigung von Phytochromlösungen benutzt. Das Verfahren, das vom KROES (59,60) ausgearbeitet wurde,

verspricht eine gute Reinigung des Phytochroms bei gleichzeitiger Konzentrierung der Lösungen.

Die Eigenschaften, die für die Adsorption von Proteinlösungen an Hydroxylapatit verantwortlich sind, sind nur teilweise aufgeklärt. Nach BERNARDI et al. (4,5) werden Proteine sowohl mit ihren negativ geladenen Gruppen an die Ca^{2+} -Ionen als auch mit ihren positiv geladenen Gruppen an die Phosphatgruppen im Apatit gebunden. Die Adsorption von Proteinen erfolgt bei möglichst geringen Ionenstärken, die Desorption kann je nach Art des gebundenen Proteins mit einer Anzahl unterschiedlicher Elutionsmittel erfolgen. Saure oder neutrale Proteine werden z.B. mit Phosphaten, basische Proteine dagegen mit CaCl_2 -Gradienten gut eluiert (5). Entsprechend der offensichtlich ionischen Natur der Bindung spielt auch der pH-Wert eine Rolle bei der Adsorption und Desorption.

Wesentliche Bedingungen, die für die Bindung von Phytochrom an Hydroxylapatit wichtig sind, sind von KROES (59) beschrieben worden. Da die Eigenschaften des Gels jedoch sehr stark von der Art seiner Herstellung abhängen, ist es notwendig, alle wesentlichen Parameter für die Adsorption und Desorption den eigenen Versuchsbedingungen anzupassen. Zur Verwendung kam zunächst Hydroxylapatit, der nach der Methode von KROES (59) hergestellt wurde, später auch solcher, der nach BERNARDI (4) hergestellt wurde.

Die Adsorption erfolgte dabei durch Zufügen einer Suspension von Hydroxylapatit zur Phytochromlösung und pH-Einstellung auf pH 6,2. Die Menge, die von KROES (59) als ausreichend zur vollständigen Adsorption von Phytochrom angegeben wurde (7-20% v : v), reichte bei den eigenen Versuchen jedoch nur in Ausnahmefällen aus. Etwa 1/3 Volumen Hydroxylapatit-Suspension waren in der Regel nötig, um das gesamte Phytochrom zu adsorbieren (vgl. auch Lit. 3). Zur Desorption wurde der nach Zentrifugation erhaltene Niederschlag in Phosphatpuffer bei pH 7,8 resuspendiert. Hier wurden mit einem 0,2 M Kaliumphosphatpuffer wesentlich höhere Ausbeuten als bei einem 0,1 M Puffer erhalten, außerdem mußte mindestens 1/4 Volumen (bezogen auf die Ausgangsmenge Rohextrakt) Puffer zum Desorbieren genommen werden (vgl. Lit. 3). Ergebnisse: siehe Tab. 5.

Tab. 5: Reinigen und Konzentrieren von Phytochromlösungen mittels Hydroxylapatit;

Adsorption: an 33 ml Hydroxylapatit-Suspension (1 : 1) je 100 ml Rohextrakt, pH 6,2; Desorption: mit 25 ml 0,2 M Kaliumphosphatpuffer je 100 ml Rohextrakt, pH 7,8.

Hydroxylapatit

	selbst hergestellt nach Lit. 4 oder 59	Produkt der Fa. Benckiser-Knapsack
Phytochrom- Ausbeute:	35-65% Mittel: 50,5%	46-61% Mittel: 53,2%
Spez. Aktivität	15-30 x 10 ⁻⁴ Mittel: 27,5 x 10 ⁻⁴	20-35 x 10 ⁻⁴ Mittel: 29,0 x 10 ⁻⁴
Anreicherung (bezogen auf den Rohextrakt)	3-6 Mittel: 5,3	4-9 Mittel: 5,9

c) Hydroxylapatit als Pulver

Hydroxylapatit $[Ca_5(OH)(PO_4)_3]$ wird als trockenes Pulver unter dem Namen "Tricalciummonophosphat" in sauberer Qualität (DAB 6) von der chemischen Industrie geliefert (Firma Benckiser-Knapsack, Ladenburg/Neckar). Durch Verwendung dieses Produkts, das stets gleichbleibende Qualität aufwies, war es möglich, die starken Schwankungen in der Phytochromausbeute zu umgehen, die mit dem unter erheblichem Arbeits- und Zeitaufwand selbst hergestellten Hydroxylapatit nicht zu vermeiden waren (vgl. Tab. 5).

Zunächst wurde der Hydroxylapatit nach mehrmaligem Waschen als Suspension eingesetzt. Dabei wurden Ergebnisse erzielt, die fast identisch mit denen bei selbst hergestelltem Hydroxylapatit waren (vgl. Tab. 5).

Das Verfahren ließ sich jedoch noch weiter vereinfachen, indem der Hydroxylapatit als trockenes Pulver zum Rohextrakt gegeben wurde. Für diese neue Methode der Adsorption und Desorption von Phytochrom wurden die günstigsten Parameter experimentell ermittelt:

1) Adsorptionskapazität des Hydroxylapatits

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Hydroxylapatit zur gleichen

Menge Rohextrakt wurde die Menge ermittelt, die zur vollständigen Bindung von Phytochrom benötigt wird (Abb.3).

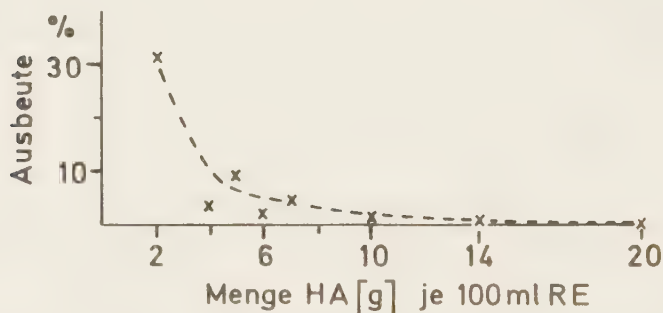


Abb. 3: P-Gehalt im Überstand der Hydroxylapatit-Adsorption (AÜ 1) in Abhängigkeit von der zugegebenen Hydroxylapatitmenge.
HA = Hydroxylapatit, RE = Rohextrakt;

Bei Zugabe von mehr als 5 g Hydroxylapatit pro 100 ml Rohextrakt ließ sich im Überstand AÜ 1 der nach 30 Minuten Rühren abzentrifugierten Suspension Phytochrom nicht mehr in nennenswerten Mengen nachweisen $[\Delta(\Delta E) < 0,0010]$. Um auch in Ausnahmefällen eine möglichst vollständige Adsorption sicherzustellen, wurden bei späteren Versuchsreihen 8 g Hydroxylapatit je 100 ml Rohextrakt zugesetzt.

2) Molarität des Phosphatpuffers zur Desorption

Um die Molarität des Phosphatpuffers zu ermitteln, die zur optimalen Desorption des Phytochroms vom Hydroxylapatit notwendig ist, wurden solche Niederschläge, die durch Adsorption von Phytochrom an 8 g Hydroxylapatit je 100 ml Rohextrakt erhalten wurden, mit gleichen Mengen Phosphatpuffer mit unterschiedlicher Ionenstärke versetzt, nach pH-Einstellung auf 7,8 30 min gerührt und abzentrifugiert. Im erhaltenen Überstand AÜ 2 wurde die Phytochrommenge gemessen (Abb. 4).

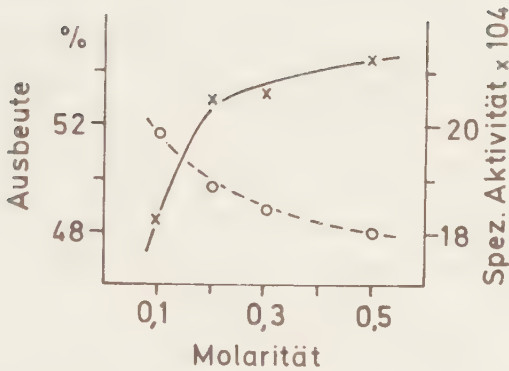


Abb. 4: Ausbeute an Phytochrom (x-x, bezogen auf den Rohextrakt) und spezifische Aktivität (o-o) im AÜ 2 nach Desorption mit Phosphatpuffer (0,1-0,5 M).

Mit steigender Ionenstärke des zur Desorption benutzten Phosphatpuffers stieg die Ausbeute an Phytochrom an; jedoch war die Steigerung im Bereich von 0,2-0,5 M nur mehr gering. Die spezifische Aktivität nahm dagegen mit steigender Molarität stetig ab. Deshalb wurde in den späteren Meßreihen nicht mit dem für höchste Ausbeuten am besten geeigneten 0,5 M, sondern mit einem 0,3 M Kaliumphosphatpuffer desorbiert, bei dem die Ausbeute nur minimal geringer war, die spezifische Aktivität jedoch deutlich erhöht war.

Durch erneutes Suspendieren des nach der 1. Desorption und anschließenden Zentrifugation erhaltenen Hydroxylapatit-Niederschlags (AÜ 3) ließ sich die Ausbeute an Phytochrom nochmals wesentlich erhöhen, ohne daß die spezifische Aktivität der erhaltenen Lösung sehr stark abnahm.

3) Menge an Phosphatpuffer zur Desorption

Je geringer die Menge an 0,3 M Phosphatpuffer gewählt wird, mit der das am Hydroxylapatit gebundene Phytochrom desorbiert wird, desto höher ist die Phytochromkonzentration im nach Zentrifugation erhaltenen Überstand AÜ 2. Allerdings nimmt gleichzeitig auch die Ausbeute an Phytochrom ab (Abb. 5).

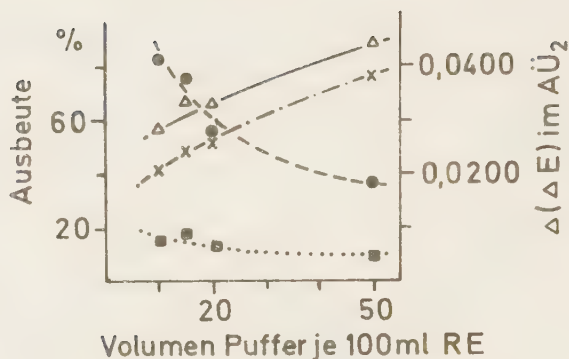


Abb. 5: Konzentration und Ausbeute an Phytochrom nach **Desorption** vom Hydroxylapatit in Abhängigkeit von der verwendeten Puffermenge:

- : $\Delta(\Delta E)$ im AÜ 2 (1. Desorption)
- x: Ausbeute im AÜ 2 (1. Desorption)
- : Ausbeute im AÜ 3 (2. Desorption)
- Δ: Gesamtausbeute im AÜ 2 + AÜ 3

Als optimale Menge wurden 20 ml Phosphatpuffer (= 1/5 Vol.) für die 1. und 10 ml (= 1/10 Vol.) für die 2. Desorption je 100 ml Rohextrakt gewählt. Auf diese Weise wird eine relativ große Volumenverringerung auf etwa 33% des Ausgangsvolumens bei einer Ausbeute von insgesamt etwa 66% (53,2% im AÜ 2 und 12,8% im AÜ 3) erreicht. Ausführliche Versuchsvorschriften: siehe Tab. 7, Ergebnisse: siehe Tab. 8.

d) Erneute Reinigung an Hydroxylapatit

Nach Entsalzen der Hydroxylapatit-Überstände (AÜ 2 und AÜ 3) durch Chromatographie an Sephadex G-50 (siehe Kap. 3.7.) ist es möglich, Phytochrom erneut an Hydroxylapatit zu binden. Es werden nur noch 4 g Hydroxylapatit je 100 ml Säuleneluat benötigt. Die Ausbeute an Phytochrom (1. Desorption 50-57%, 2. Desorption 10-15%) ist ähnlich wie bei der ersten Reinigung an Hydroxylapatit, jedoch konnte im Gegensatz zu den Angaben von KROES (59) keine weitere Reinigung erzielt werden (Anreicherung 0,9-1,2).

3.6. Konzentrieren durch Ammoniumsulfatfällung

a) Konzentrieren von Hydroxylapatit-Überständen (AÜ 2 und AÜ 3)

Versuche zur Konzentrierung von Hydroxylapatit-Überständen durch Ammoniumsulfatfällung ergaben, daß ein Teil des Phytochroms bei 33% Sättigung noch in Lösung blieb. Deshalb erfolgte die Fällung bei 40% Sättigung an Ammoniumsulfat. Die Ausbeute an Phytochrom nach Wiederauflösen des Niederschlags war stark vom Volumen abhängig, in dem resuspendiert wurde (Abb. 6).

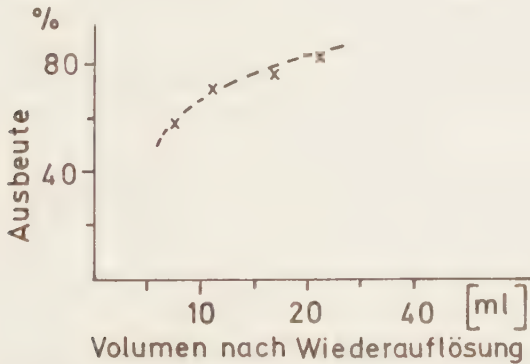


Abb. 6: Ausbeute an Phytochrom im Überstand ASF-Ü 2 nach Fällung mit Ammoniumsulfat (40% Sättigung) in Abhängigkeit vom Volumen nach Wiederauflösen in Puffer.

Zur Vermeidung zu hoher Verluste an Phytochrom wurde in der Regel mit 20 ml Puffer je 100 ml Ausgangslösung (AÜ 2 und AÜ 3) resuspendiert. Ausführliche Arbeitsvorschrift: Tab. 7.

Die Ammoniumsulfatfällung war mit einer Abtrennung von Verunreinigungen verbunden, die entweder im Überstand der Fällung blieben oder beim Auflösen des Phytochroms nicht in Lösung gingen, so daß eine Reinigung um den Faktor 3-4 erzielt wurde (vgl. Tab.8).

b) Konzentrieren von Säuleneluaten

Die Konzentration von Säuleneluaten erfolgte durch Ammoniumsulfatfällung bei 50% Sättigung (31,3 g Ammoniumsulfat je 100 ml Lösung, vgl. Tab. 7). Die hohe Ammoniumsulfatkonzentration war

zur Vermeidung von Verlusten an Phytochrom bei der Fällung aus sehr verdünnten Lösungen erforderlich.

Eine fraktionierte Fällung mit dem Ziele einer Reinigung des Phytochroms ließ sich nicht praktizieren, da das Phytochrom über einen weiten Sättigungsbereich an Ammoniumsulfat gefällt wurde, wie am Beispiel eines Sephadex-G-50-Säuleneluats gezeigt wurde: Der Niederschlag nach 25%iger Sättigung an Ammoniumsulfat enthielt schon 20,6% Phytochrom, der Niederschlag nach 25-50%iger Sättigung enthielt nur weitere 52,8%, im Überstand konnte kein Phytochrom mehr nachgewiesen werden. Bei Weiterverarbeitung nur einer der beiden Fraktionen müßte also stets mit einem großen Verlust an Phytochrom gerechnet werden. Bei der Konzentrierung verschiedener Säuleneluats wurden die in Tab. 6 zusammengefaßten Ergebnisse erhalten. Dabei wurden häufig die Eluate von mehreren Säulenläufen gleichzeitig konzentriert.

Tab. 6: Konzentration von Säuleneluaten durch Ammoniumsulfatfällung (50% Sättigung). Alle Werte sind auf 100 ml zu konzentrierende Lösung bezogen.

	vor der Fällung		nach Auflösen der Fällung			
	$\Delta(\Delta E)$	P-Einheiten	Vol. [ml]	$\Delta(\Delta E)$	P-Einheiten	Ausbeute
G-50-Eluat (Hauptfrakt.)	0,0495	4,95	12,57	0,3107	3,906	78,9% (71-95%)
G-50-Eluat (Nebenfrakt.)	0,0118	1,18	5,72	0,1682	0,961	81,4% (65-92%)
G-200-Eluat (Hauptfrakt.)	0,0140	1,40	2,56	0,5015	1,282	91,5%
DEAE-Eluat	0,0503	5,03	5,04	0,865	4,36	86,7% (84-95%)

Es fällt auf, daß die nach der Ammoniumsulfatfällung zurückerhaltene Menge an Phytochrom nach G-200 Chromatographie erheblich höher ist als auf früheren Stufen (siehe Abschnitt a), obwohl der Niederschlag in einem sehr viel kleineren Volumen aufgelöst wurde. Dies bedeutet, daß während der Reinigung die meisten phytochrom-denaturierenden Begleitsubstanzen entfernt wurden, so daß die Phytochromlösungen zunehmend stabiler werden.

3.7. Sephadex - Gelfiltration

3.7.1. G-50-Chromatographie

Die nach Ammoniumsulfatfällung von Hydroxylapatit-Überständen erhaltenen Lösungen (ASF-Ü 2) wurden über Sephadex G-50 - Säulen gereinigt (Ergebnisse in Tab. 8). Auf die verwendeten Säulen (10 x 23 cm) konnte man bis zu 250 ml Lösung auftragen, ohne die Säule zu überlasten.

Die Säulenchromatographie an Sephadex G-50 hat folgende Vorteile:

- 1) Es wird eine gute Abtrennung von niedermolekularen, gelb gefärbten Stoffen erzielt. Diese Verunreinigungen erscheinen im Elutionsdiagramm weit hinter dem Ausschlußpeak, der auch das Phytochrom enthält. Dieser Reinigungseffekt macht sich jedoch nur sehr gering in einer Erhöhung der spezifischen Aktivität bemerkbar, da nur wenig Fremdproteine entfernt werden.
- 2) Nach der G-50 - Chromatographie läßt sich das Eluat durch Ammoniumsulfatfällung so weit konzentrieren (vgl. Kap. 3.6.b), daß das nach Extraktion von 2 kg Keimlingen noch vorhandene Phytochrom (~50-60 ml) leicht auf 2 parallel betriebenen Sephadex G-200 - Säulen aufgetragen werden kann (vor der G-50 - Chromatographie wären 6 solcher Säulen nötig).
- 3) Während der beiden Ammoniumsulfatfällungen vor und nach der Sephadex G-50 - Chromatographie sowie während der Chromatographie selbst findet ein proteolytischer Abbau von Phytochrom statt, der zu der niedermolekularen Form (Molekulargewicht ~72.000; vgl. Kap. 3.10.) führt. Dies führt dazu, daß bei der späteren Sephadex G-200 - Chromatographie (siehe unten) Phytochrom im wesentlichen in einem einzigen (Haupt-)Peak erscheint.

3.7.2. G-200 - Chromatographie

Die Gelfiltration an Sephadex G-200 ist einer der wirksamsten Reinigungsschritte bei der Isolierung von Phytochrom. Auf Grund des Molekülsiebeffektes des Gels erscheint die Hauptmenge an Phytochrom weit hinter dem viele Fremdsubstanzen enthaltenden Ausschlußpeak. Auf diese Weise wird das Phytochrom also von einem sehr großen Teil der hauptsächlich hochmolekularen, zum Teil aber auch noch von restlichen niedermolekularen Fremdsubstanzen gereinigt.

An dieser Stelle der Reinigung zeigen die phytochromhaltigen Lösungen zum erstenmal ein deutliches Proteinmaximum bei 280 nm, während vorher das Maximum der Extinktion stets bei etwa 260 nm lag. Dies zeigt, daß ein großer Teil der abgetrennten Substanzen Nukleinsäuren ($\lambda_{\text{Max}} \approx 260 \text{ nm}$) sind.

Das Elutionsdiagramm einer Sephadex G-200 - Chromatographie ist in Abb 7 gezeigt. Die Resultate der Versuche sind in Tab. 8 enthalten.

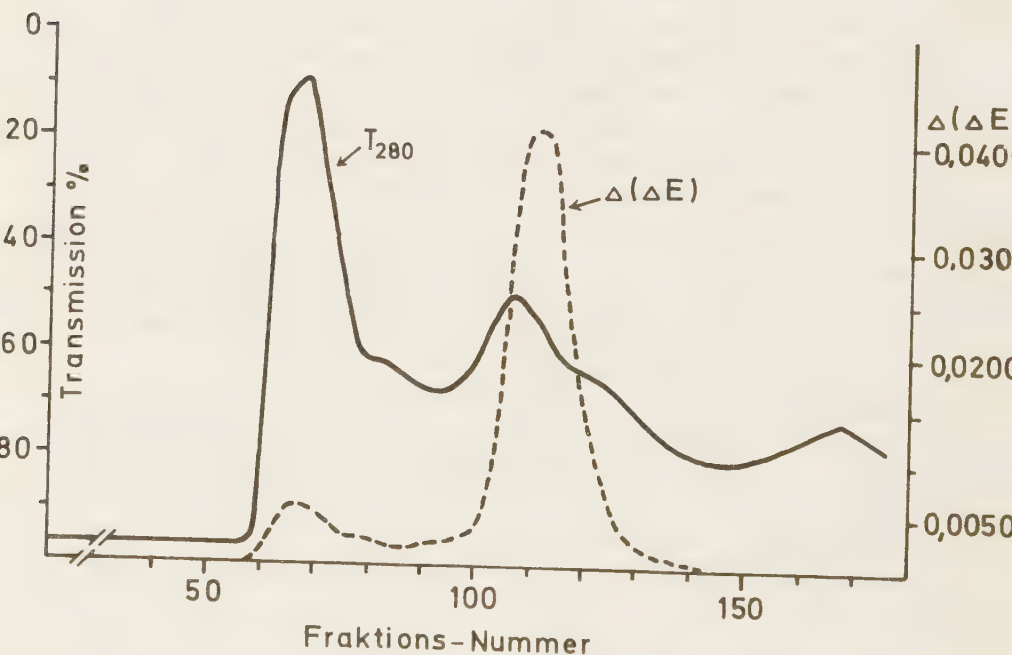


Abb. 7: Sephadex G-200 - Chromatographie

Säule: 5 x 69 cm; aufgetragen: 17,2 ml aufgelöster Ammoniumsulfatniederschlag nach Sephadex G-50 - Chromatographie mit $\Delta(\Delta E) = 0,348, 5,98$ P-Einheiten; Puffer: 0,01 M Tris, 1 mM NaN_3 , 0,1 M KCl (pH 7,8); Durchfluß: 29 ml/h; 7,2 ml Eluat pro Fraktion.

T_{280} = Transmission des Eluats bei 280 nm.

Bei Sephadex G-200 - Chromatographie auf einer früheren Stufe der Phytochromreinigung, die prinzipiell auch möglich ist, erscheint das Phytochrom in 3 Fraktionen. Zwischen der im Ausflußpeak befindlichen kleinen Menge an sehr hochmolekularem Phytochrom und dem niedermolekularen Anteil (großer Peak in Abb. 7) erscheint ein weiterer P-haltiger Peak, dessen P-Aktivität je nach Dauer der Aufarbeitung schwankt. Um möglichst viel P in einer einheitlichen Form zu erhalten, ist es also günstig, die G-200 - Chromatographie erst nach Umwandlung des Phytochroms in seine niedermolekulare Form durchzuführen (siehe Kap. 3.7.1).

3.8. DEAE-Sephadex-Ionenaustauscher-Chromatographie

Eine weitere Reinigung von Phytochromlösungen erfolgte durch Ionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Sephadex A-50 (116a). Es wurden entweder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrate nach G-200 - Chromatographie, die noch über kurze Sephadex G-50 - Säulen (2,5 x 20 cm) entsalzt werden mußten, oder die Eluate nach Sephadex G-200 direkt aufgetragen. Die Elution des Phytochroms, das bei Auftragen der Lösung mit Startpuffer (0,02 M Tris-Cl-Puffer pH 7,8; 0 M oder 0,1 M KCl) gebunden wurde, erfolgte durch Gradientenelution mit einem von 0 bzw. 0,1 M auf 0,5-0,8 M KCl steigenden Salzgradienten. Phytochrom wird bei relativ geringen Salzkonzentrationen im ansteigenden Teil des Hauptproteinpeaks eluiert. (siehe Abb. 8).

Das eluierte Phytochrom wird in 2 Teilen aufgefangen, wobei der erste Teil (Hauptfraktionen) die höchste Phytochromaktivität und die geringste Fremdproteinmenge enthält.

Die Hauptfraktionen werden je nach Verwendungszweck entweder durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert oder nach Dialyse gefriergetrocknet.

3.9. Zusammenstellung der Reinigungsschritte und Ergebnisse bei der Isolierung von Phytochrom in großem Maßstab

Die Isolierung und Reinigung von Phytochrom aus Haferkeimlingen gelang in großem Maßstab durch Aneinanderreihen der beschriebenen Schritte. Dabei konnten bis zu 4 kg Keimlinge nach dem in Tab. 7 zusammengefaßten Verfahren aufgearbeitet werden. Es wurden die in Tab. 8 angegebenen Ergebnisse erzielt. Das Absorptionsspektrum einer nach Tab. 7 gereinigten Phytochromlösung wird in Abb. 9 gezeigt.

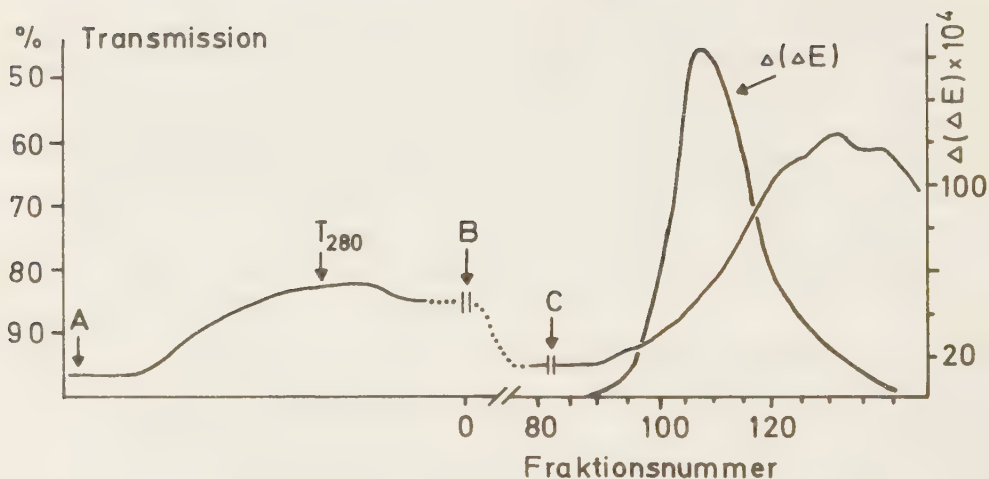


Abb.8: DEAE-Sephadex A-50 - Ionenaustauscher-Chromatographie
Säule: 2,5 x 13 cm; aufgetragen: 716 ml G-200 - Eluat (Hauptfraktionen); Elution: KCl-Gradient von 0,1 M auf 0,5 M steigend in 0,01 M Tris-0,01 M EDTA-0,001 M NaN_3 -Puffer (pH 7,8). Elution mittels hydrostatischem Druck (80 cm); 6,6 ml Eluat je Fraktion.

Zeichen: A: Beginn des Auftrags
B: Waschen mit Startpuffer
C: Beginn der Gradientenelution

} verkürzt eingezeichnet

T_{280} = Transmission des Eluats bei 280 nm.

Tab. 7: Arbeitsvorschrift für die Isolierung und Reinigung von Phytochrom aus Haferkeimlingen

Abkürzungen: HA = Hydroxylapatit, AS = Ammoniumsulfat

Vorgang (Reinigungsschritt)	Erhaltene Fraktion
-----------------------------	--------------------

1) Aufschluß der Keimlinge und Extraktion:

2-4 kg Keimlinge (tiefgefroren) vorsichtig in lauwarmem Wasser auftauen, in einem 4 l-Mixer in 1/2 Vol. (w : v) Extraktionspuffer (0,1 M Tris-Cl, 0,01 M Na_2SO_3 , pH 7,8) mixen (in 2 Portionen), durch ein Tuch pressen → Filtrat

Filtrat 40 min bei 18.000 g abzentrifugieren → Rohextrakt RE

Tab. 7 (Fortsetzung)

2a) Adsorption an Hydroxylapatit (HA):

8 g HA je 100 ml RE zugeben, mit 1 N HCl
pH 6,2 einstellen, 30 min rühren, 20 min
bei 18.000 g zentrifugieren

→ HA-Überstand AÜ 1

→ HA-Niederschlag

2b) alternativ: Nur eine Probe des Filtrats
scharf abzentrifugieren, zum Rest sofort
wie unter 2a) beschrieben HA zugeben

3a) Desorption:

HA-Niederschlag in 1/5 Vol. (bezogen auf
das Vol. des RE bzw. des Filtrats) 0,3 M
Kaliumphosphatpuffer pH 8,1 (0,01 M Na_2SO_3)
resuspendieren, pH-Wert mit 1 N KOH auf 7,8
einstellen, 30 min rühren, 20 min bei 18.000 g
zentrifugieren

→ Überstand AÜ 2

→ HA-Niederschlag

3b) 2. Desorption:

Niederschlag erneut wie unter 3a) resus-
pendieren, jedoch mit 1/10 Vol. (bezogen
auf RE bzw. Filtrat)

→ Überstand AÜ 3

4) Ammoniumsulfatfällung:

AÜ 2 und AÜ 3 vereinigen, innerhalb 30 min
mit 25 g pulverisiertem Ammoniumsulfat (AS)
je 100 ml Lösung versetzen, 30 min rühren,
45 min bei 18.000 g zentrifugieren.

Den erhaltenen Niederschlag in 1/5 Vol.

(bezogen auf AÜ 2 + AÜ 3) resuspendieren,
vorsichtig homogenisieren, 30 min rühren,

30 min bei 40.000 g zentrifugieren → Überstand ASF-Ü 2

5) Sephadex G-50 - Chromatographie:

AS-Konzentrat ASF-Ü 2 auf Sephadex G-50-
Säule (10 x 23 cm) auftragen, mit 0,02 M
Tris-Cl-Puffer (0,01 M EDTA, 0,001 M NaN_3)
pH 7,8 eluieren. Das im Ausschlußpeak er-
scheinende Phytochrom sammeln* → G-50 - Eluate

Tab. 7 (Fortsetzung)

6) Ammoniumsulfatfällung:

G-50 - Eluat (Hauptfraktionen) wie unter 4) beschrieben konzentrieren, jedoch: Fällung mit 31,3 g AS je 100 ml Lösung, 30 min Zentrifugation bei 40.000 g, Wiederauflösen des Niederschlags in 1/10 Vol.

—————→ ASF-Ü 4

7) Sephadex G-200 - Chromatographie:

Auftragen des AS-Konzentrates ASF-Ü 4 auf eine (bzw. mehrere) Sephadex G-200 - Säule(n) (5 x 80 cm). Elution mit 0,01 M Tris-0,1 M KCl-Puffer (0,01 M EDTA, 0,001 M NaN_3) pH 7,8*

—————→ G-200 - Eluate

8) Ammoniumsulfatfällung:

Hauptfraktionen des G-200 - Eluats wie unter 6) beschrieben konzentrieren, Wiederauflösen des Niederschlags in möglichst wenig (1/20-1/50 Vol.) Puffer

—————→ ASF-Ü 6

9a) DEAE-Sephadex - Chromatographie:

ASF-Ü 6 über eine kurze Sephadex G-50 - Säule (2,5 x 20 cm) entsalzen (Pufferwechsel); —→ G-50-II-Eluat im Ausschlußpeak erscheinendes Eluat sofort auf eine DEAE-Sephadex - Säule (2,5 x 15 cm) geben, mit Startpuffer (0,02 M Tris oder 0,01 M Tris-0,1 M KCl) waschen, mit Gradient aus 250 ml Startpuffer und 250 ml 0,6 M KCl in Startpuffer eluieren*

—————→ DEAE - Eluate

9b) alternativ:

G-200 - Eluat sofort auf DEAE-Sephadex - Säule geben, sonst wie unter 9a)

10a) Ammoniumsulfatfällung:

DEAE - Eluat (Hauptfraktionen) wie unter 8) konzentrieren

—————→ ASF-Ü 8

10b) alternativ: Dialyse und Gefriertrocknung

DEAE - Eluat gegen dest. Wasser dialysieren und anschließend lyophilisieren

—————→ gefriergetrocknetes Produkt

* Die Hauptfraktionen mit der höchsten Phytochromaktivität und die vorher und nachher erscheinenden Nebenfraktionen werden getrennt gesammelt. Die Nebenfraktionen werden nach Konzentrieren mit Ammoniumsulfat erneut gereinigt.

Tab. 8: Reinigung von Phytochrom nach der in Tab. 7 angegebenen Vorschrift

Fraktion	Volumen [ml]	$\Delta(\Delta E)$	P- Einheiten	Ausbeute [%] bezogen auf letzte Stufe	Protein- konz. [mg/ml]	Spezif., Akt. $\times 10^4$	Anreicherung bezogen auf letzte Stufe	RE	Reinheits- index
3 kg Keimlinge									
Filtrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RE	3700	.	.	.	.	.	.	.	(5360**)
AÜ2	3600	0,0123	44,28	100	23,9	5,15	1	1	2134
AÜ3	825	0,0285	23,51	53,1	14,36	19,84	3,86	3,86	1498
AÜ2 + AÜ3 vereinigt	375	0,0151	5,66	12,8	9,74	15,50	3,02	3,02	1960
ASF-Ü2	1200	0,0243	29,17	65,9	12,92	18,48	.	3,68	.
G-50-E1 (Hauptfr.)	253	0,0967	24,45	83,8	15,8	61,2	3,31	11,9	487
G-50-E2 (Nebenfr.)	635	0,0300	19,05	77,9	4,1	73,2	1,20	14,2	396
ASF-Ü4	296	0,0076	2,25	9,2	.	.	.	.	.
G-200-E1*	80	0,1885	15,08	79,2	19,9	94,7	1,29	18,4	155
G-200-E2*	580	0,0173	10,03	66,5	0,49	353,1	3,73	68,6	37,8
ASF-Ü6	655	0,0024	1,57	10,4	.	.	.	.	.
G-50-II-Eluat	15	0,618	9,27	92,4	14,6	423,3	1,20	82,2	30,2
DEAE-E1 (Hauptfr.)	44	0,190	8,36	90,2	.	.	.	.	.
DEAE-E2 (Nebenfr.)	124	0,0371	4,60	55,0	0,34	1091	2,58	212	12,1
ASF-Ü8	260	0,0097	2,52	30,1	.	.	.	.	.
	8,5	0,485	4,12	89,6	3,99	1215	1,11	236	9,7

* Summe von 3 Läufen à 25-30 ml ASF-Ü4; ** $\Delta(\Delta E)$ -Wert vom RE eingesetzt

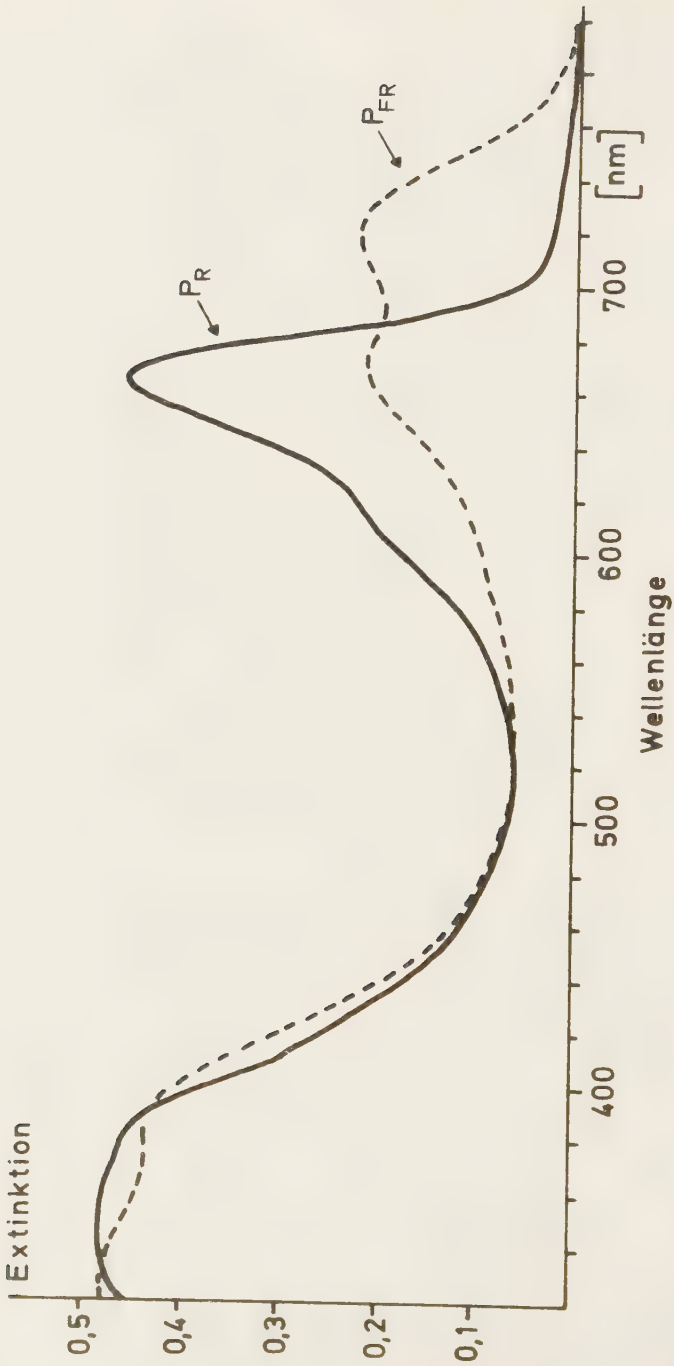


Abb. 9: Absorptionsspektrum von gereinigtem Haerphytochrom (ASF-Ü8, vgl. Tab. 8); $\Delta(\Delta E) = 0,431$; Spezif. Aktivität = 0,095; Reinheitsindex = 8,1

3.10. Molekulargewichtsbestimmung

Schon bei einem der ersten Versuche zur Reinigung von Phytochrom fiel auf, daß Phytochrom bei Gelfiltration über Sephadex G-100 in 2 Fraktionen eluiert wurde. Dabei variierten die Anteile der ersten (im Ausschlußpeak) und der zweiten (wesentlich später eluierten) Fraktionen von Mal zu Mal.

Genauere Untersuchungen dieser Erscheinung auf kalibrierten Sephadex G-200 - Säulen zeigten, daß Phytochrom in einer wenig gereinigten Lösung sogar in 3 Formen vorliegt. (Abb. 10).

Die Molekulargewichte dieser 3 Formen lassen sich durch Vergleich mit Eichproteinen und Auswertung der erhaltenen säulenchromatographischen Trennungen nach der Formel (vgl. Lit. 116):

$$\log \text{Molekulargewicht} = f (\text{Fraktionsnummer})$$

annähernd bestimmen (Tab. 9 und Abb. 11).

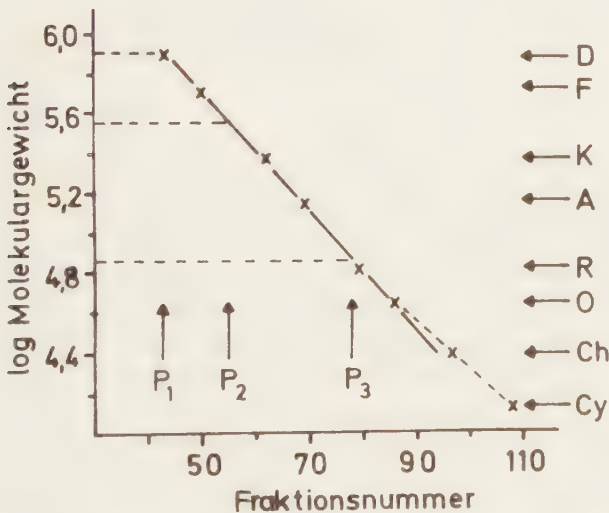


Abb. 11: Molekulargewichtsbestimmung von Phytochrom aus Sephadex G-200 durch Vergleich mit Eichsubstanzen; Abkürzungen: siehe Tab. 9

Auf späteren Stufen der Isolierung (Abb. 7) findet man die Phytochromform mit mittlerem Molekulargewicht (P_2) nicht mehr; neben einer geringen Menge an P_1 ($MW \geq 800.000$) tritt nur mehr die niedermolekulare Form P_3 ($MW \approx 72.000$) auf.

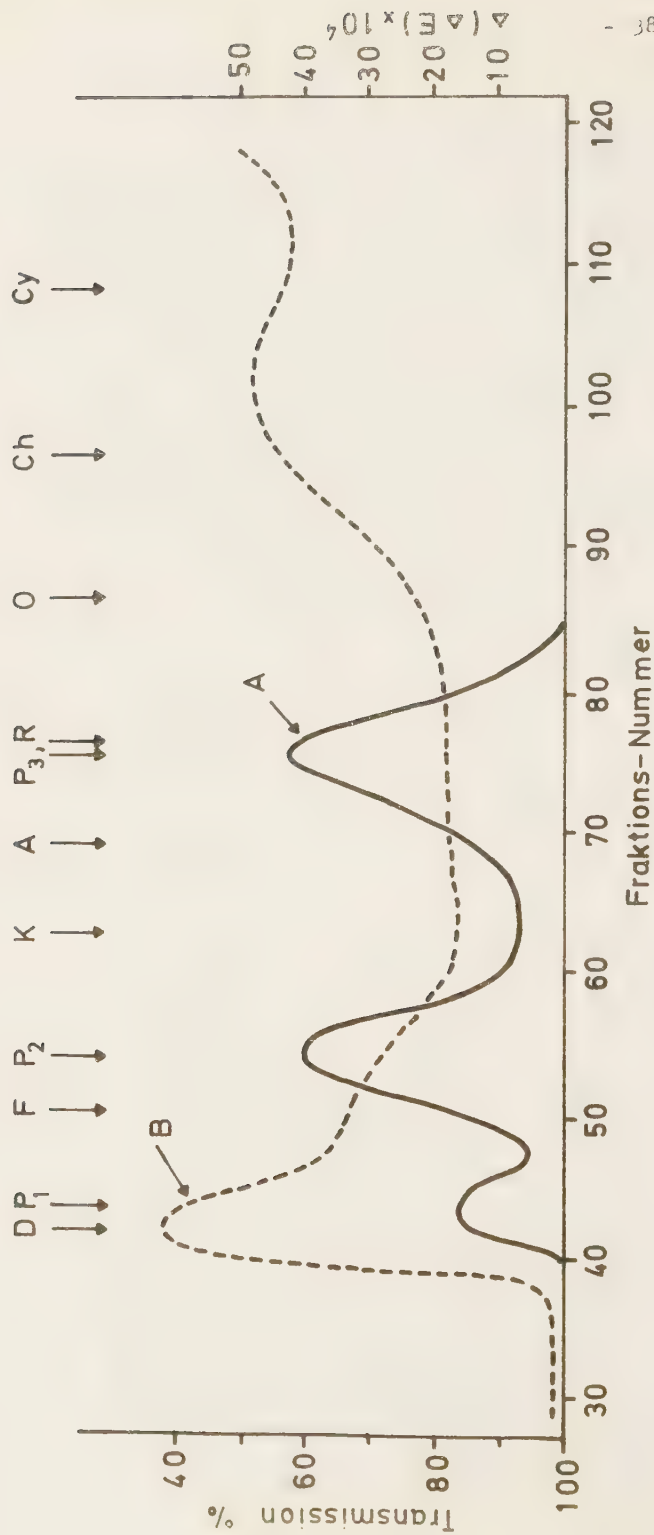


Abb. 10: Molekulargewichtsbestimmung von Phytochrom durch Gelfiltration an Sephadex G-200. Säule: 2,5 x 76 cm; Puffer: 0,02 M Tris-0,001 M Na₂CO₃, pH 7,8; Durchfluß: 10 ml/h; 3 ml je Fraktion; aufgetragen: 5 ml AU 2; aufgezeichnet ist die Transmission T₂₈₀ des Eluats (Kurve B) und die Phytochromkonzentration $\Delta(\Delta E)$ (Kurve A); P₁, P₂, P₃: Phytochromfraktionen. Die Positionen von Eichsubstanzen, die unter identischen Bedingungen bestimmt wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet; Abkürzungen: siehe Tab. 9.

Tab. 9: Molekulargewichte der 3 Phytochromformen und der Eichsubstanzen (vgl. Abb. 10 und 11)

Phytochrom-Fraktion bzw. Eichsubstanz	Abkürzung	Fraktion- Nr.	Molekular- gewicht
Dextranblau	D	43	2.000.000*
Ferritin	F	50	540.000
Katalase	K	62	240.000
Aldolase	A	69	158.000
Albumin aus Rinderserum	R	79	67.000
Albumin aus Hühnerei	O	86	45.000
Chymotrypsinogen A	Ch	97	25.000
Cytochrom c	Cy	108	12.500
Phytochrom	P ₁	43	800.000
Phytochrom	P ₂	55	360.000
Phytochrom	P ₃	78	72-73.000

*scheinbares Molekulargewicht 800.000

3.11. Diskussion

Das beschriebene Verfahren liefert Phytochrom in einer Gesamtausbeute von ca. 10% mit einem Reinheitsindex $E_{280}/\Delta(\Delta E)$ von etwa 10 in der zuletzt erhaltenen Lösung ASF-Ü 8, das entspricht einem Phytochromgehalt von 10% des Gesamtproteins. Auch die spezifische Aktivität von etwa 0,1-0,12 entspricht einer Reinheit von 10-12% (Tab. 8). Durch Weiterreinigung der bei den einzelnen Chromatographieverfahren erhaltenen Nebenfraktionen kann eine Erhöhung der Ausbeute erreicht werden.

Das Spektrum einer solchen Phytochromlösung (Abb. 9) zeigt im Bereich zwischen 500 und 800 nm fast keine Fremddabsorption mehr. Bei der Reinigung des Phytochroms nach der in Tab. 7 beschriebenen Vorschrift wurden einige wesentliche Änderungen gegenüber in der Literatur angegebenen Verfahren gemacht:

1) Durch Erhöhung der Anzuchttemperatur von 25° (vgl. Lit. 59, 98, 119) auf 28°C konnte die Wachstumsdauer der Keimlinge auf 4 Tage verkürzt werden, ohne daß sich der Phytochromgehalt der Keimlinge verringerte (Kap. 2.5. und 3.3.). Die nach der Ex-

traktion erhaltene Phytochrommenge entspricht den in der Literatur (Tab. 2) berichteten höchsten Werten (Kap. 3.3.).

2) Die Anwendung von Hydroxylapatit in Pulverform zur Reinigung von Phytochrom im "batch"-Verfahren gelang nach Ausarbeitung von optimalen Bedingungen zur Adsorption und Desorption des Phytochroms (Kap. 3.5.c). Dies brachte wesentliche Vorteile für die Reinigung:

Der Hydroxylapatit konnte zu einem nicht abzentrifugierten Filtrat gegeben werden, so daß eine Zentrifugation des großen Volumens nach Extraktion entfiel.

Die sehr zeit- und arbeitsintensive Herstellung des Hydroxylapatits nach der Methode von SIEGELMAN et al. (122) oder BERNARDI (4) entfiel.

Die konstante Qualität des Hydroxylapatit-Pulvers garantierte im Gegensatz zu den stark schwankenden Eigenschaften des selbst hergestellten Produktes eine gleichbleibende Ausbeute und Reinigung bei der Adsorption und Desorption des Phytochroms.

Der Reinigungsfaktor (3-4) und die Ausbeute (insgesamt 60-70%) bei der "batch"-Adsorption mit festem Hydroxylapatit entsprechen den von KROES (59) bei Verwendung von Suspensionen angegebenen Werten.

Die bei Brushit-Chromatographie (98) erreichten Reinigungsfaktoren liegen allerdings höher, dafür bietet die "batch"-Adsorption den Vorteil, erheblich schneller zu sein, bei der Verarbeitung großer Volumina wesentlich einfacher zu sein und zusätzlich eine Konzentrierung des Extraktes um den Faktor 3 zu bringen. Außerdem entfallen die bei Brushit häufig auftretenden unkontrollierbaren Veränderungen seiner Eigenschaften (59,107).

3) Nach Konzentrieren durch Ammoniumsulfatfällung, Sephadex G-50 - Chromatographie und erneuter Konzentration der Hydroxylapatit-Überstände liegt das Phytochrom im wesentlichen in einer einheitlichen Molekülgröße (siehe Kap. 3.10.) vor, so daß nun die Chromatographie an Sephadex G-200 zu einem guten Reinigungseffekt führt (Abb. 7).

4) Die Ammoniumsulfatfällungen wurden auf der ersten Stufe (nach Reinigung an Hydroxylapatit) bei einer Sättigung von 40%, auf späteren Stufen (nach Säulenchromatographie) bei 50% Sättigung durchgeführt. Die Angaben über die Konzentration an Ammo-

niumsulfat, bei der Phytochrom aus seinen Lösungen gefällt wird, schwanken zwischen 33% (37,87), 40% (98) und 50% (48,59) Sättigung. Da hier keine Fraktionierung des Phytochroms erfolgen sollte, sondern Wert auf eine hohe Ausbeute gelegt wurde, wurden die höheren Konzentrationen an Ammoniumsulfat von 40 bzw. 50% gewählt (Kap. 3.6.). Hierbei blieb kein Phytochrom mehr in Lösung, trotzdem wurde eine gute Abtrennung von Fremdproteinen (Tab. 8) erzielt.

5) Der Ersatz des übelriechenden 2-Mercaptoäthanol durch Natriumsulfit (99) bewährte sich. In mit Natriumsulfit erhaltenen Rohextrakten wurde keine Rot- oder Grünfärbung der Lösung (z.B. durch Polymerisation von Phenolen) beobachtet, wie sie in Extrakten auftritt, die ohne Reduktionsmittel hergestellt wurden. Die Ionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Sephadex hat einen guten Reinigungseffekt, führt allerdings auch zu einem relativ großen Verlust an Phytochrom (Ausbeute nur ca. 55% in den Hauptfraktionen, Tab. 8). Trotz dieses Mangels führt das angegebene Verfahren mit geringem Arbeitsaufwand zur Gewinnung von relativ sauberem Phytochrom, das sich zur Untersuchung wichtiger Eigenschaften des Pigments eignete (Kap. 4.).

Sephadex G-200 - Chromatographie von wenig gereinigten Phytochromlösungen brachte zum erstenmal den Nachweis von hochmolekularem Phytochrom bei Hafer. Gefunden wurden 3 Phytochromformen mit Molekulargewichten von ≥ 800.000 , 360.000 und $72-73.000$ (Kap. 3.10.).

Das Auftreten von 3 Phytochrom-Fractionen wurde inzwischen durch Arbeiten von PRATT (87) bestätigt, der bei Gelchromatographie auf Biogel P-300 Phytochrom mit Molekulargewichten von 440.000 und 60.000 (bei einigen Versuchen: 90.000) sowie Spuren von Phytochrom im Ausschlußpeak fand.

Phytochrom-Formen mit einem Molekulargewicht um 180.000 (BRIGGS et al., Lit. 14) oder 110.000 (ROUX, zitiert in Lit. 13) konnten hier nicht entdeckt werden.

Die hier beschriebene Phytochrom-Form mit einem Molekulargewicht von 360.000 unterliegt während der Aufarbeitung des Phytochroms dem Angriff von Proteasen, die im Hafer in hoher Konzentration enthalten sind (85) und die das Phytochrom zum Teil spezifisch zur niedermolekularen Form (37,85) abbauen. Dadurch erklärt sich,

daß die hochmolekulare Form (P_2) bei früheren Arbeiten (59,78, 98) nie aus Hafer isoliert werden konnte. Sie tritt nur auf frühen Stufen der Phytochrom-Isolierung bei raschem Arbeiten auf und verschwindet auf späteren Reinigungsstufen ganz zugunsten der niedermolekularen Form, die bei Isolierung von Haferphytochrom allgemein gefunden wird (37,59,78,98).

Das hochmolekulare Phytochrom (MW 360.000) entspricht offensichtlich dem aus Roggen isolierten Phytochrom mit einem Molekulargewicht von 375.000 (98). Dieses Molekül wird als Dimeres eines bei SDS-Gelelektrophorese gefundenen Moleküls mit einem Molekulargewicht von 120.000 angesehen, von dem man annimmt, daß es die native, monomere Form des Phytochroms ist (13,97). Die Diskrepanz zwischen dem für hochmolekulares Phytochrom durch Gelfiltration gefundenen Molekulargewicht von 360-440.000* und dem sich für ein Dimeres ergebenden Wert von 240.000 ist ungeklärt. Versuche von GARDNER (zitiert in Lit. 98) mit Gleichgewichtszentrifugation sprechen für ein Molekulargewicht von 240.000 des nativen Moleküls, so daß man annehmen muß, daß das hohe Molekulargewicht des Phytochroms bei Gelfiltration durch eine nicht globuläre Struktur vorgetäuscht wird.

Die Natur des im Ausschlußpeak der G-200 - Chromatographie erscheinenden Phytochroms ist unbekannt. Hier muß noch geklärt werden, ob es sich um ein sehr hoch (>6fach) aggregiertes Phytochrom handelt oder ob es sich um ein Aggregat aus Phytochrom und anderen Zellbestandteilen handelt. Auch ist offen, ob die Aggregation erst während der Extraktion auftritt (Artefakt !) oder ob sie das Ergebnis einer schon in der Zelle ablaufenden Bindung des Phytochroms an einen "Rezeptor" ist (vgl. Kap. 5.).

* Die bei der Sephadex G-200 - Chromatographie gefundenen Differenzen im Molekulargewicht beruhen auf der Ungenauigkeit der Methode in diesem Bereich.

4. Struktur der Phytochrom-Chromophore

4.1. Einleitung

Die ersten Aussagen über die Struktur des Phytochrom-Chromophors wurden schon 1950 gemacht (11), also noch ehe das Phytochrom selbst entdeckt war. Wegen der großen Ähnlichkeit zwischen den Spektren von Allophycocyanin und dem Aktionsspektrum für photomorphogenetische Prozesse nahm man an, daß hier wie dort ein Gallenfarbstoff für die spektralen Eigenschaften im sichtbaren Bereich verantwortlich war.

Diese Vermutung wurde später erstmals durch SIEGELMAN et al. (121) bestätigt. Durch Hydrolyse in siedendem Methanol konnten diese Autoren den Phytochrom-Chromophor in geringer Ausbeute isolieren. Sowohl die Spektraldaten in saurem Methanol als auch die R_F -Werte bei Dünnschichtchromatographie stimmten weitgehend mit dem aus Allophycocyanin und Phycocyanin abgespaltenen Chromophor überein, der eine Bilatrien-Struktur hat. Ausgehend von diesen vorläufigen Ergebnissen und denen einiger anderer Arbeitsgruppen (59,109,134), die ebenfalls nicht sehr detailliert waren, wurden eine ganze Reihe Hypothesen aufgestellt, die die Photoumwandlung des Phytochroms erklären wollten.

Die meisten dieser Modelle nehmen an, daß die Bildung von P_{FR} aus P_R mit einer Verlängerung des chromophoren Systems durch Wanderung einer (109) oder von ~~zwei~~ Doppelbindungen (Anstieg der Konjugation von 7 auf 10 Doppelbindungen !, Lit. 118) verbunden ist. Andere Modelle formulieren eine cis-trans-Isomerie an den Methinbrücken zwischen den Pyrrolringen (46) oder eine Wanderung von Wasserstoffatomen oder Protonen (1,25,46,58), verbunden mit einer Lactam-Lactim-Tautomerie an den endständigen Ringen. Die genaue Struktur des Phytochrom-Chromophors blieb aber offen, vor allem blieb ungeklärt, ob die 2 Formen von Phytochrom einen einzigen Chromophor in 2 unterschiedlichen Konformationen enthalten, die durch das Apoprotein stabilisiert werden, oder ob 2 chemisch verschiedene, aber verwandte Chromophore existieren. Durch verschiedene Methoden (Blitzlichtbestrahlung, Tieftemperaturmessungen, Messung von lyophilisierten Geweben und Extrakten) konnten mehrere Zwischenstufen bei der Phototransformation von Phytochrom nachgewiesen werden (65,89,126). Einige dieser Zwi-

schenstufen, die auch im dehydratisierten Zustand gebildet werden, entstehen wahrscheinlich durch Photoreaktionen und anschließend ablaufende Umwandlungen des Chromophors, während die Bildung nur bei Gegenwart von Wasser nachweisbarer Zwischenstufen ebenso wie die Bildung der stabilen Endstufen P_R und P_{FR} mit Strukturveränderungen des Proteins (und des Chromophors) verbunden ist (128).

Auch aus der unterschiedlichen Reaktivität von P_R und P_{FR} (14,20 100,101) und der Messung von UV-, CD- und ORD-Spektren (2,48,58) wurde geschlossen, daß die Phototransformation mit einer reversiblen Veränderung der Proteinkonformation gekoppelt ist.

Alle diese Untersuchungen lassen jedoch über die Struktur des Chromophors und seine Verknüpfung mit dem Protein nur wenige Aussagen zu, da die gelieferten Daten gleichzeitig von Chromophor- und Proteineigenschaften beeinflusst werden. Auch die Meßdaten, die in erster Linie auf den Eigenschaften des Chromophors beruhen, wie z.B. die Spektren im langwelligen Bereich, sind sehr stark durch das Protein beeinflusst und führen möglicherweise zu falschen Aussagen. Ebenso sind die bisher nach Abspaltung des Chromophors erhaltenen Versuchsergebnisse nur mit Vorsicht zu interpretieren, da die Abspaltung zu einer Veränderung des nativen Chromophors führt. Bei den Biliproteiden aus Algen bildet sich z.B. bei der Hydrolyse der ursprünglichen Thioätherbindung ein Pyrrolring mit Äthylidenseitenkette aus, man erhält also eine Verlängerung des chromophoren Systems (55,106).

Um eine Aussage über die Struktur des nativen Phytochrom-Chromophors in seinen beiden photoreversiblen Formen zu machen, ist es also günstig, wenn man den Einfluß des Proteinanteils im Molekül auf den Chromophor ausschalten kann, ohne daß dadurch eine Veränderung im Molekülbau des Chromophors entsteht. Außerdem verspricht eine kürzlich neu entwickelte Methode zur chemischen Strukturaufklärung von Biliproteid-Chromophoren (Ammoniakabbau, Lit. 114,115) neue Erkenntnisse über die Struktur des Chromophors und seine Bindung ans Protein.

4.2. Spektralmessungen der Phytochrom-Chromophore und anderer Gallenfarbstoffe

Der Einfluß des Apoproteins führt bei Biliproteiden zu einer mehr oder weniger starken Verschiebung der Chromophorabsorption zu längeren Wellenlängen (82,104,106). Die wahre Absorption des Chromophors kann jedoch ohne Abspaltung des Proteinrestes beobachtet werden, wenn die Peptidkette z.B. durch Zusatz von 6 M Guanidiniumchlorid entfaltet wird. KÖST et al. (55) zeigten, daß Guanidiniumchlorid selbst keinen Einfluß auf die Absorption von freien Gallenfarbstoffen oder von Chromophoren der Biliproteide hat.

4.2.1. P_R in Guanidiniumchlorid

In einer 6 M Guanidiniumchloridlösung verändert sich das Absorptionsspektrum von P_R drastisch. Bei pH 1,5 verschiebt sich das Maximum im langwelligen Bereich von 662 nm (nativ) nach 675 nm mit einer deutlichen Schulter bei 620-640 nm (Abb. 12, Kurven A und B). Gleichzeitig sinkt die Absorption am Maximum auf etwa die Hälfte ab: $E_{662}(\text{nativ}) : E_{675}(\text{denaturiert}) = 2,1$. Bei längerem Stehen (1 Tag) bleibt das Spektrum der Lösung unverändert. Bei höheren pH-Werten (z.B. bei pH 8) verringert sich die Absorption des Chromophors im Vergleich zum nativen Protein weiter, das Absorptionsmaximum verschiebt sich nach 620-625 nm mit einer Schulter bei 580 nm (Abb. 12, Kurve C). Bei pH-Werten zwischen 4 und 8 treten Spektren auf, deren Maxima (650 nm bei pH 4,8; 630 nm bei pH 5,8) zwischen denen der beiden beschriebenen Formen liegen. Bei Erhöhung des pH-Wertes auf 12 zeigt das Spektrum ein Maximum bei 765-770 nm (Abb. 12, Kurve D), das für Gallenfarbstoff-Anionen (hier: P_R -Anion) charakteristisch ist. Das P_R -Anion ist selbst unter Stickstoff nicht stabil und wandelt sich leicht unter Ausbleichen des langwelligen Maximums in eine Substanz mit einem Maximum bei 585 nm um.

Auch ein Zink-Komplex konnte nach Denaturierung von P_R gebildet werden. Er zeigt ausgeprägte Maxima bei 650 und 590 nm. Die bei pH-Wert-Änderung eintretende Veränderung des Absorptionsspektrums (Abb. 12) ist charakteristisch für alle Gallenfarbstoffe und beruht auf einer stufenweisen Deprotonierung der basischen Stickstoffatome der Pyrrolringe.

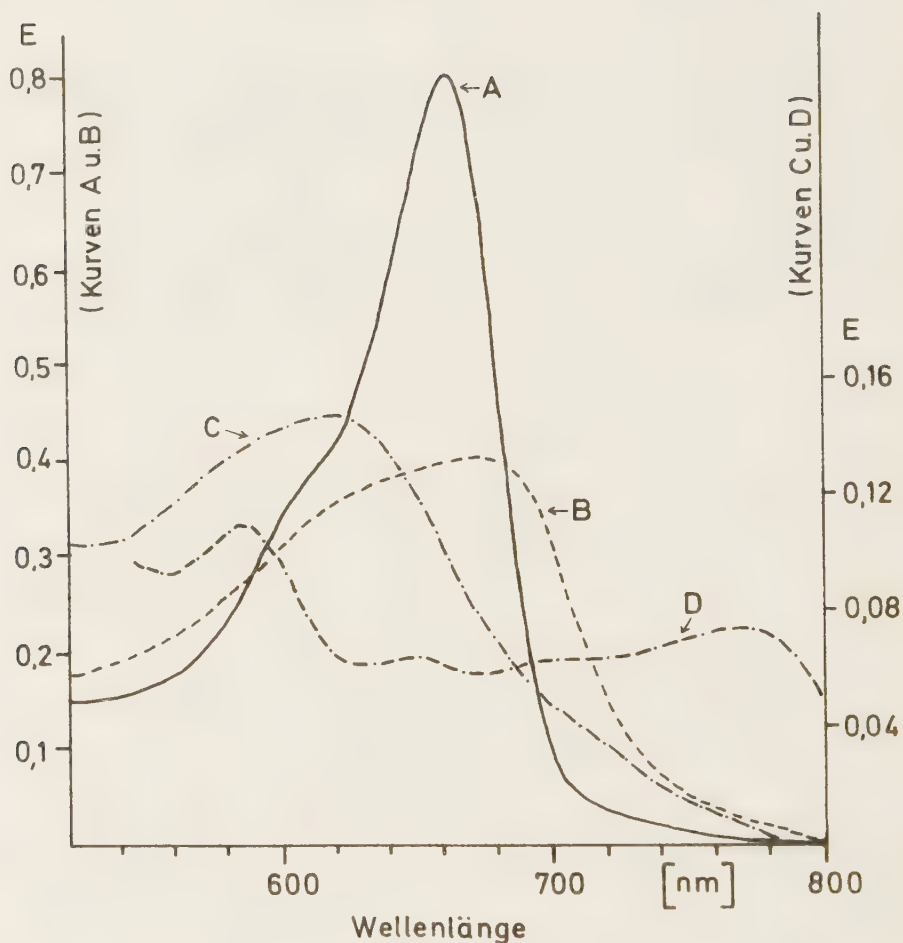


Abb. 12: Spektren von nativem P_R und vom P_R -Chromophor bei verschiedenen pH-Werten

A: natives P_R ; B: P_R -Chromophor als Kation (pH 1,5);
 C: P_R -Chromophor als freie Base (pH 8,5); D: P_R -Chromophor als Anion (pH 12)

Die Kurven A und B sowie die Kurven C und D sind im jeweils gleichen Maßstab gezeichnet.

4.2.2. Phycocyanin in Guanidiniumchlorid

Die Spektren des P_R -Chromophors als Kation und als freie Base (Abb. 12) zeigen große Ähnlichkeit mit den bekannten Spektren des Phycocyanin-Chromophors, jedoch liegen die in der Literatur (55) angegebenen Absorptionsmaxima teilweise um 40 nm tiefer als die bei P_R gefundenen. Deshalb wurden die Messungen, die bei P_R beschrieben wurden, unter den gleichen Bedingungen mit C-Phycocyanin aus *Pseudanabaena* sp. (vgl. Kap. 2.6.) und *Anacystis nidulans** wiederholt.

Dabei ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung der Spektren von P_R und Phycocyanin in 6 M Guanidiniumchloridlösung (Abb. 13). Das beim nativen Phycocyanin bei 618 nm liegende Absorptionsmaximum verschiebt sich bei Denaturierung in saurer Lösung (pH 1,5) nach 665-670 nm mit einer Schulter bei 630 nm. Auch hier nimmt die Extinktion ähnlich wie beim Phytochrom auf 41% ($E_{668}/E_{618} = 0,41$) ab (Abb.13).

Bei pH 8 nimmt die Extinktion weiter auf 14% (natives Protein = 100%) ab, das Maximum der freien Base liegt bei 612 nm (mit Schulter bei 590 nm). Dieses Maximum ($E_{612}/E_{590} = 1,1$) wird jedoch nur unter strikt anaeroben Verhältnissen beobachtet, bei Luftzutritt fällt die Extinktion bei 612 nm beträchtlich ab, so daß man ein Maximum bei 590 nm mit Schulter bei 610 nm findet ($E_{610}/E_{590} = 0,95$).

Abb. 13 zeigt, daß auch Phycocyanin bei pH ~12 ein Anion mit einem Maximum bei 760 nm bildet, das jedoch wie das P_R -Anion instabil ist. Man erkennt deutlich das allmähliche Ausbleichen des Maximums bei 760 nm und die gleichzeitige Neubildung eines Maximums bei 592 nm. Diese zeitliche Änderung des Spektrums macht es wahrscheinlich, daß das Anion durch Oxydation in das Produkt mit $\lambda_{Max} = 592$ nm umgesetzt wird.

Der Zinkkomplex des Phycocyanin-Chromophors hat Maxima bei 640 und 590 nm.

Die langwelligen Absorptionsmaxima liegen demnach beim Phycocyanin-Chromophor gegenüber dem P_R -Chromophor um ca. 10 nm zu kürzeren Wellenlängen verschoben, was auf ein etwas kürzeres Doppelbindungssystem schließen läßt.

*Herrn H.-P. Köst danke ich für eine Probe des Pigments.

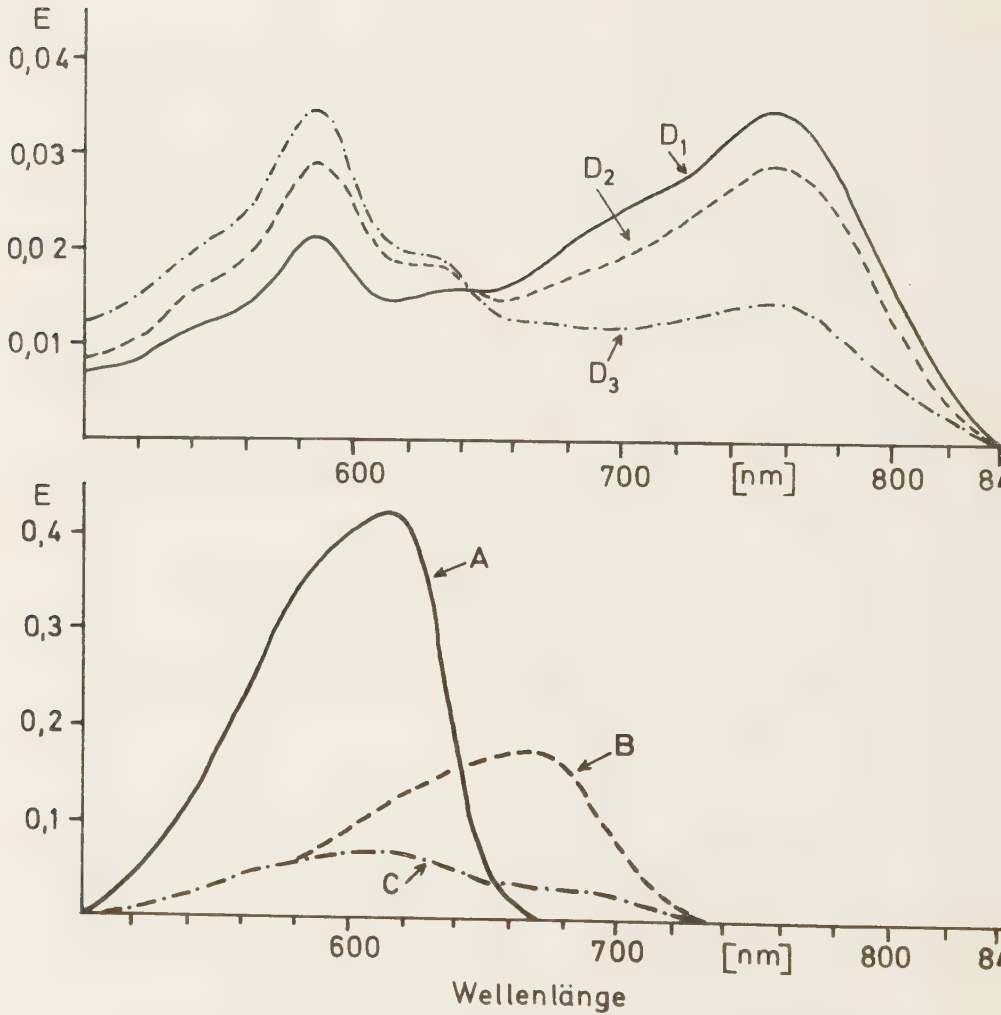


Abb. 13: Spektren von Phycocyanin und seinem Chromophor bei verschiedenen pH-Werten

unten: A: natives Phycocyanin; B: Phycocyanin-Chromophor als Kation (pH 1,5); C: Phycocyanin-Chromophor als freie Base (pH 8);

oben: D: Phycocyanin-Chromophor als Anion (pH 12); D₁: unmittelbar nach Mischen von Phycocyanin und Guanidiniumchlorid; D₂: gleiche Lösung nach 5 min; D₃: gleiche Lösung nach weiteren 5 min.

Zwischen Phycocyanin aus *Pseudanabaena* sp. und *Anacystis nidulans* konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

4.2.3. P_{FR} in Guanidiniumchlorid

Die Zugabe von Guanidiniumchlorid zu einer P_{FR} -Lösung brachte ein unerwartetes Ergebnis:

Das langwellige Absorptionsmaximum des P_{FR} -Chromophors in saurer Lösung liegt bei 610-615 nm (Abb. 14) und damit um 60-65 nm unterhalb der Absorption des P_R -Chromophors. Die Absorption des Phytochrom-Chromophors verschiebt sich also bei der Phototransformation $P_R \rightarrow P_{FR}$ zu kürzeren Wellen, während das native Chromoprotein dabei eine Verschiebung zu längeren Wellen (662 $\rightarrow$ 718 nm) zeigt.

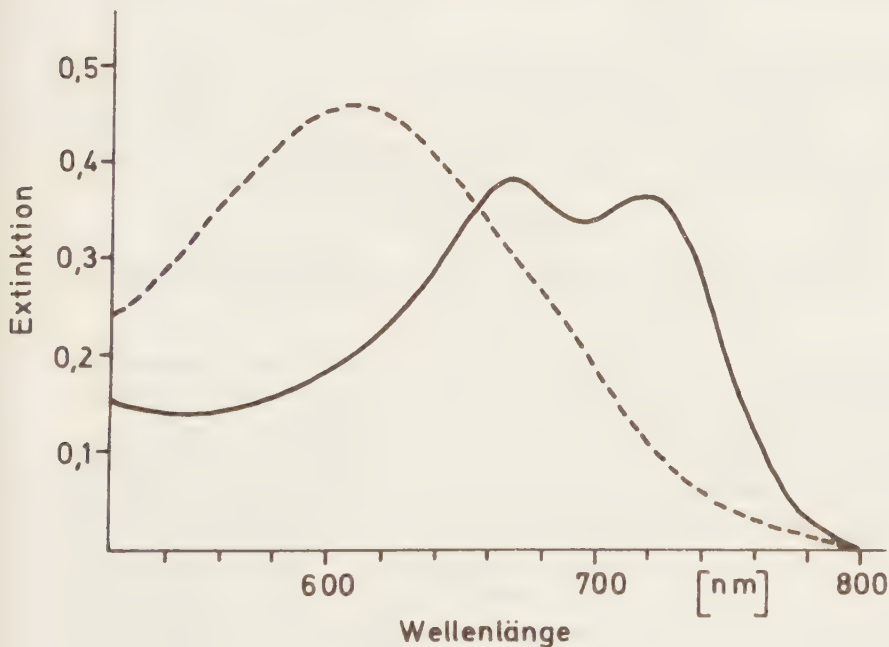


Abb. 14: Spektrum von nativem P_{FR} (—) und seinem Chromophor (---, als Kation bei pH 1,5)

Eine Abnahme in der Höhe der Extinktion bei der Denaturierung tritt nicht ein ($E_{718} [\text{nativ}] : E_{615} [\text{denat.}] = 0,9$), jedoch

fallen die im nativen Chromophor vorhandenen 2 Maxima (718 und 668 nm) nach Denaturierung zusammen. Beim P_{FR} -Chromophor läßt sich jedenfalls nur eine sehr schwache Schulter bei 675-680 nm beobachten (Abb. 14), die vom restlichen Anteil von ca. 20% P_R stammt, der bei der Phototransformation stets übrig bleibt (16). Versuche, den P_{FR} -Chromophor bei höheren pH-Werten (> 5) zu erhalten, schlugen fehl. Denaturierung von P_{FR} bei pH-Werten > 7 ergab unmittelbar das Spektrum der P_R -Base, oberhalb pH 10 wurde stets das P_R -Anion erhalten. Hier scheint also eine sehr rasche Umwandlung des P_{FR} -Chromophors in den P_R -Chromophor einzutreten, selbst wenn die Denaturierung und sämtliche Messungen im Dunkeln durchgeführt werden.

4.2.4. Phototransformation des P_{FR} -Chromophors

Im Dunkeln sind sowohl der P_R - als auch der P_{FR} -Chromophor in saurer Lösung stabil. Im Licht dagegen (Weißlicht oder monochromatisches Licht der Wellenlänge 610 nm) tritt eine sofortige Umwandlung des denaturierten P_{FR} in denaturiertes P_R ein (Abb. 15). Eine Veränderung von denaturiertem P_R wird ebensowenig wie die von denaturiertem Phycocyanin im Licht beobachtet.

4.2.5. Spektrophotometrische Titration von Phytochrom und Phycocyanin (pK-Werte)*

Die pK-Werte für den Übergang Kation/freie Base sowie Base/Anion sind für jeden Gallenfarbstoff charakteristische Werte, die Aussagen über die Struktur des Chromophors zulassen (40,106). Je stärker das bindende Elektronenpaar der N-H-Bindung an einem Pyrrolstickstoff delokalisiert ist, d.h. je ausgedehnter das konjugierte System eines Chromophors ist, desto tiefer liegt der pH-Wert, bei dem z.B. der Übergang Kation/freie Base stattfindet. Da eine direkte Titration der denaturierten Biliproteide nicht möglich ist (gleichzeitige Titration der Aminosäuren des Proteinrestes), wurden die Biliproteide in Guanidiniumchloridlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert denaturiert, die Spektren der erhaltenen Mischungen gemessen und der pH-Wert kontrolliert (vgl. Kap. 2.7.).

Trägt man die Extinktion beim Maximum einer Form (z.B. des Kations:

* Die Versuche zur spektralphotometrischen Titration von Phycocyanin wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Zimmermann durchgeführt.

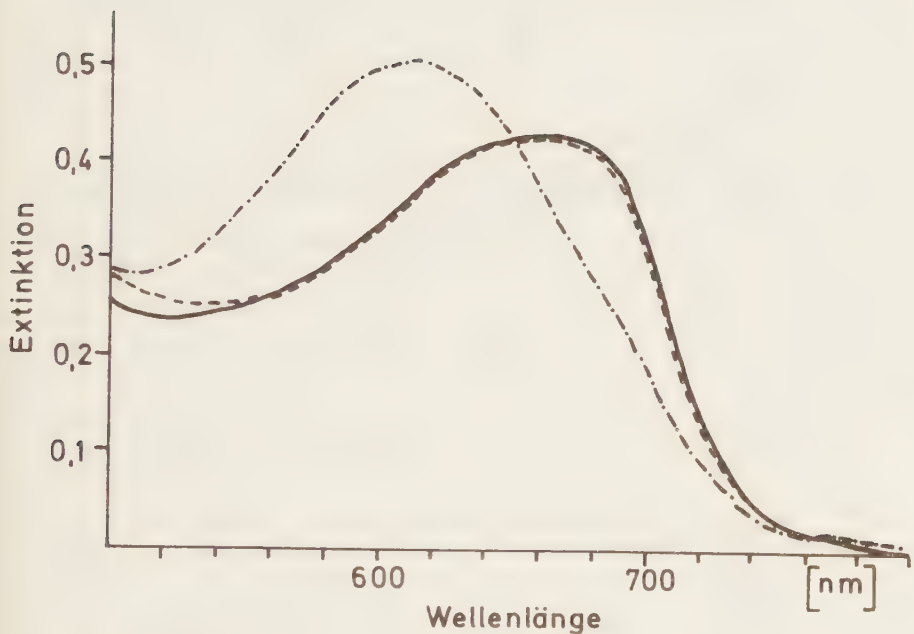


Abb. 15: Photoumwandlung von denaturiertem P_{FR}

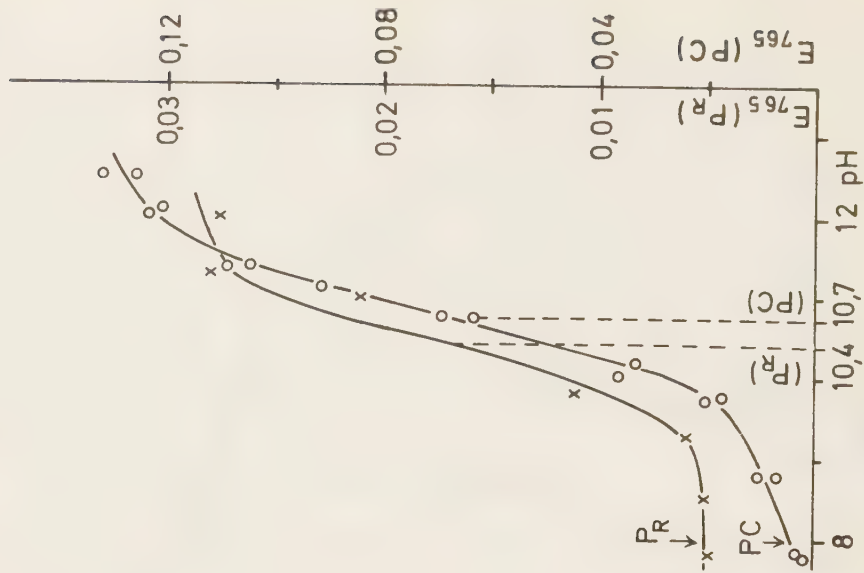
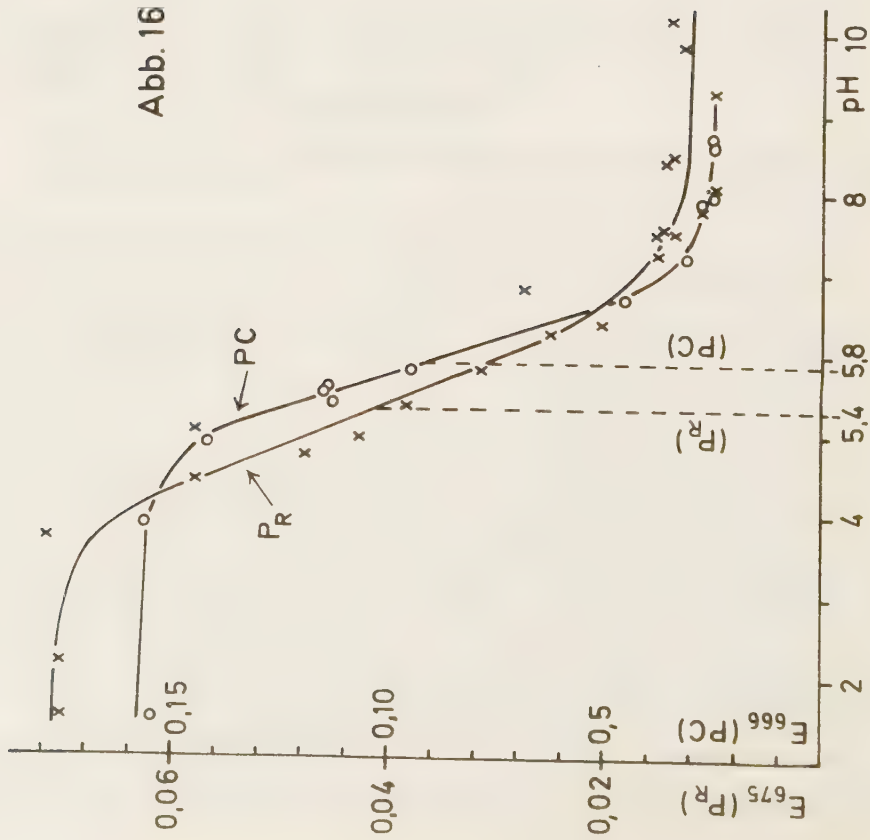
- · - P_{FR} denaturiert bei pH 1,5
- - - gleiche Lösung nach Bestrahlung mit 10 sec Weißlicht
- P_R denaturiert bei pH 1,5

P_R = 675 nm, Phycocyanin = 665 nm; Anion: 765 nm) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung auf, so erhält man typische Titrationskurven (Abb. 16), deren Wendepunkte die pK-Werte für den Übergang Kation/freie Base bzw. Base/Anion sind.

Aus Abb. 16 erhält man für den Übergang Kation/Base die pK-Werte 5,4 (P_R) und 5,8 (Phycocyanin) und für den Übergang Base/Anion die pK-Werte 10,4 (P_R) und 10,7 (Phycocyanin).

Die geringen Unterschiede im pK-Wert zwischen P_R und Phycocyanin zeigen wieder die Ähnlichkeit der beiden Chromophore; die beim P_R etwas niedrigeren Werte sprechen für eine geringe Verlängerung des chromophoren Systems gegenüber dem Phycocyanin.

Versuche, auf die gleiche Weise einen pK-Wert für eine mögliche Deprotonierung des P_{FR} -Kations zur freien Base zu erhalten, hatten keinen Erfolg. Es wurde lediglich eine Umwandlung des P_{FR} -Kations



zur P_R -Base mit einem pK-Wert von 5,4 gemessen, der identisch mit dem pK-Wert für den Übergang P_R -Kation/ P_R -Base ist. Bei pH 4-7, wo eine Mischung aus P_{FR} -Kation und P_R -Base vorliegt, wurden nach Belichtung von Lösungen nur Spektraländerungen beobachtet, die von einem Übergang P_{FR} -Kation/ P_R -Base herrühren (vgl. Kap. 4.2.3.).

4.2.6. Chemische Veränderung der Phytochrom- und Phycocyanin-Chromophore bei Zugabe von Oxydations- und Reduktionsmitteln

In Kap. 4.2.3. wurde beschrieben, daß bei Versuchen, die freie Base des P_{FR} -Chromophors zu fassen, stets eine sofortige Umwandlung in den entsprechenden P_R -Chromophor eintrat. Eine ähnliche Erscheinung ist auch beim nativen Phytochrom in-vivo und in-vitro unter dem Begriff "Dunkelreversion" bekannt (18,77). In hochgereinigtem Phytochrom läßt sich diese Dunkelreversion durch eine Reihe von Reduktionsmitteln wie NADH, Natriumdithionit oder reduziertes Ferredoxin fördern (79).

Daher lag es nahe zu untersuchen, ob sich die beschriebene Umwandlung des P_{FR} -Chromophors in den P_R -Chromophor bei pH-Werten oberhalb 4 durch Zusatz eines milden Oxydationsmittels hemmen läßt oder ob so eine Stabilisierung des P_{FR} -Chromophors als freie Base oder als Anion möglich ist.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Der P_{FR} -Chromophor wird in saurer Lösung (pH 1,5-3) durch Zugabe von 0,1 mM Kalium-hexacyanoferrat-(III) in seinem Spektralverhalten nicht verändert. Bei höheren pH-Werten konnten keine Aussagen aus den erhaltenen Spektren gemacht werden, da sie keine Maxima im Bereich von 550-800 nm zeigten.

Andere Reagentien, z.B. 10^{-4} M Hexacyanoferrat-(II), Cystein

Abb. 16: Spektrophotometrische pH-Titration der Chromophore von Phytochrom (P_R : x-x-x) und Phycocyanin (PC: o-o-o). Die Spektren wurden in Glycin/HCl oder Glycin/NaOH-Lösungen mit 6 M Guanidiniumchlorid gemessen. Die Extinktionen bei 675 nm (P_R) und 665 nm (Phycocyanin) wurden um die Extinktion bei 575 nm korrigiert, die Werte bei 765 nm wurden auf die Extinktion bei 900 nm bezogen.

und 2-Mercaptoäthanol ergaben ebenfalls keine Spektralveränderungen des P_{FR} -Chromophors in saurer Lösung; d.h. er ist gegen milde Oxydations- und Reduktionsmittel stabil.

Die Einwirkung von 0,1 mM Hexacyanoferrat-(III) auf denaturiertes P_R führte jedoch zu einer drastischen Verschiebung des Spektrums (Abb. 17) zu kürzeren Wellenlängen. Das bei pH 1,5 gemessene Spektrum war identisch mit dem, das bei P_{FR} -Denaturierung gefunden wurde. Dies bedeutet, daß die Oxydation des P_R -Chromophors zu einem Chromophor führt, dessen Spektralverhalten identisch mit dem des P_{FR} -Chromophors ist. Die Umwandlung erfolgt bei Raumtemperatur augenblicklich, und das Ausmaß der Umwandlung hängt von der zugegebenen Menge Hexacyanoferrat-(III) ab. Die Schulter im Spektrum bei 680 nm (Abb. 17) dürfte daher von restlichem P_R -Chromophor stammen.

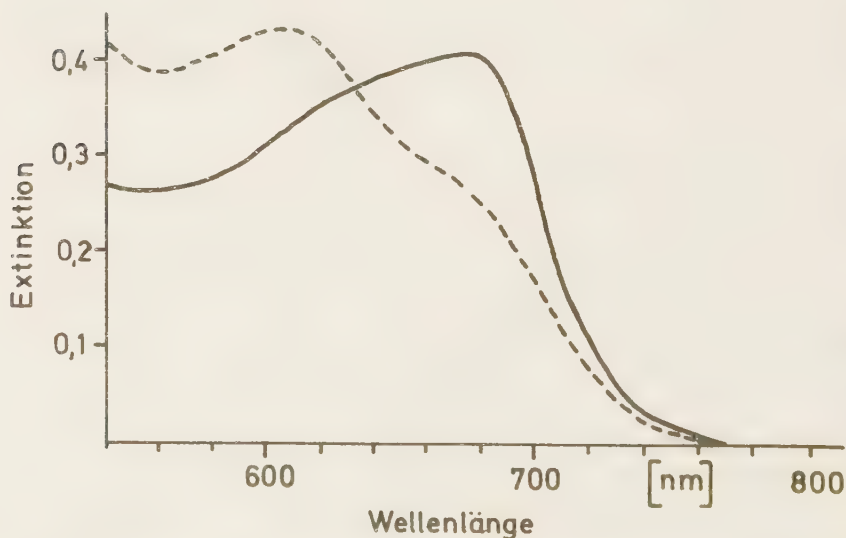


Abb. 17: Oxydation des P_R -Chromophor-Kations mit 10^{-4} M Kaliumhexacyanoferrat-(III)

—: P_R -Chromophor-Kation; ----: gleiche Lösung nach Zugabe von 10^{-4} M Kaliumhexacyanoferrat-(III)

Zusatz von Reduktionsmitteln, z.B. Hexacyanoferrat-(II) oder Cystein blieb auch bei Bestrahlung unwirksam. Ein übereinstimmendes Verhalten zeigte denaturiertes Phycocyanin. Die Oxydation in saurer Lösung mit 10^{-4} M Hexacyanoferrat-(III) lieferte eine Verbindung mit $\lambda_{\text{Max}} = 600-605$ nm und einer Schulter bei 570 nm. In neutraler Lösung wurde ein Oxydationsprodukt mit $\lambda_{\text{Max}} = 520-530$ nm gemessen. Reduktionsmittel wie Hexacyanoferrat-(II) oder 2-Mercaptoäthanol hatten keinen Einfluß auf die Spektren des Phycocyanin-Kations.

Das im Vergleich zu Hexacyanoferrat-(III) wesentlich stärkere Oxydationsmittel Cer-(IV)-sulfat reagierte in saurer Lösung wie dieses ($\lambda_{\text{Max}} = 600-605$ nm), in neutraler Lösung bildete sich jedoch neben dem Maximum bei 520-530 nm ein weiteres bei 570-580 nm aus.

Das Anion des Phycocyanin-Chromophors bleibt sowohl gegenüber Hexacyanoferrat-(III) als auch gegen Cer-(IV)-sulfat inert.

4.2.7. Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf Phycocyanin

Bei der Einwirkung von 2-Mercaptoäthanol auf natives Phycocyanin war von RÜDIGER und KÖST (zitiert in Lit. 108) ein reversibles Ausbleichen beobachtet worden. Dies war Anlaß zu einer genaueren Untersuchung dieser Erscheinung auch beim denaturierten Phycocyanin.

Bei nativem Phycocyanin führt die Zugabe von 2-Mercaptoäthanol tatsächlich zu einem reversiblen Ausbleichen der Absorption bei 618 nm, jedoch erscheint an dessen Stelle ein neues Maximum bei ~ 410 nm. Bei Verdünnen mit Wasser erscheint das Spektrum des nativen Phycocyanins wieder (isosbestischer Punkt bei ~ 465 nm); bleibt die Lösung jedoch in Gegenwart hoher Konzentrationen an Mercaptoäthanol (50 Vol.-%) längere Zeit stehen, so ist die Veränderung irreversibel.

Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei denaturiertem Phycocyanin beobachtet werden. Hier zeigte sich in saurer Lösung (pH 2-3) zwar keine Veränderung, bei Zusatz von Mercaptoäthanol zu einer mit Hexacyanoferrat-(III) oxydierten Lösung verschwand die Absorption bei 600-605 nm jedoch bei gleichzeitiger Neubildung eines Maximums bei 410-415 nm. Das gleiche ergab sich bei Einwirkung von 2-Mercaptoäthanol auf die freie Base (nicht oxydiert) des Phycocyanins.

4.2.8. Spektren von anderen Gallenfarbstoffen in Guanidinium-chloridlösung und ihre Veränderung bei Zusatz von Oxydations- und Reduktionsmitteln

Zur besseren Einordnung der gefundenen Meßergebnisse wurden außer mit Phycocyanin noch weitere Vergleichsmessungen mit anderen Gallenfarbstoffen durchgeführt.

Ein synthetisch hergestelltes Phycobiliverdin* (Abb. 18, II) zeigte ebenso wie der P_R - sowie der Phycocyanin-Chromophor bei Zusatz von Hexacyanoferrat-(III) in saurer Lösung eine sofortige Spektralverschiebung von 680-685 nm (Schulter bei 640 nm) nach 600 nm (Schulter bei 570-580 nm). Bestrahlung mit Weißlicht, monochromatischem Licht (660 nm) sowie Zusatz von Cystein blieben ohne Einfluß.

Phycoerythrin jedoch (Abb. 18, IIIb) reagierte nach Denaturieren bei den üblichen Konzentrationen (10^{-4} M) an Hexacyanoferrat-(III) nicht. Erst bei wesentlicher Erhöhung des Oxydationspotentials, z.B. bei Zugabe von Ce^{4+} -Ionen, verschwindet die Absorption des Phycoerythrin-Chromophors (Kation) bei 563 nm, und es erscheint ein neues Maximum bei 498 nm (Schulter bei 520 nm), was auf die Bildung eines Urobilin-Chromophors ($\lambda_{Max} = 492-499$ nm, Lit. 55, 106) hindeutet.

Mesobiliverdin-dimethylester (I), der einen voll durchkonjugierten Chromophor mit 11 Doppelbindungen (einschließlich der $>C=O$ - Doppelbindungen, vgl. Lit. 55, 106) hat, reagiert ebenfalls nicht mit Hexacyanoferrat-(III), mit Ce -(IV)-sulfat erfolgt jedoch eine Oxydation zu einem Chromophor, der in saurer Lösung bei 593 nm (Schulter bei 560 nm; vorher 697 nm mit Schulter bei 640 nm) und in neutraler Lösung bei 575-580 nm (vorher 666 nm) absorbiert. Bei längerer Einwirkung von Ce -(IV)-sulfat in saurer Lösung wird auch hier die Bildung eines Urobilin-Chromophors beobachtet ($\lambda_{Max} \approx 500$ nm).

Als weitere Vergleichssubstanz wurde Mesobilipurpurin (IVb) nach einer von RÜDIGER (103) beschriebenen Methode aus Mesobiliverdin-dimethylester hergestellt. Die nach Dünnschichtchromatographie des Reaktionsgemisches erhaltene purpurfarbene Hauptfraktion

* Herrn Dr. H. Scheer danke ich für die freundliche Überlassung des Präparates.

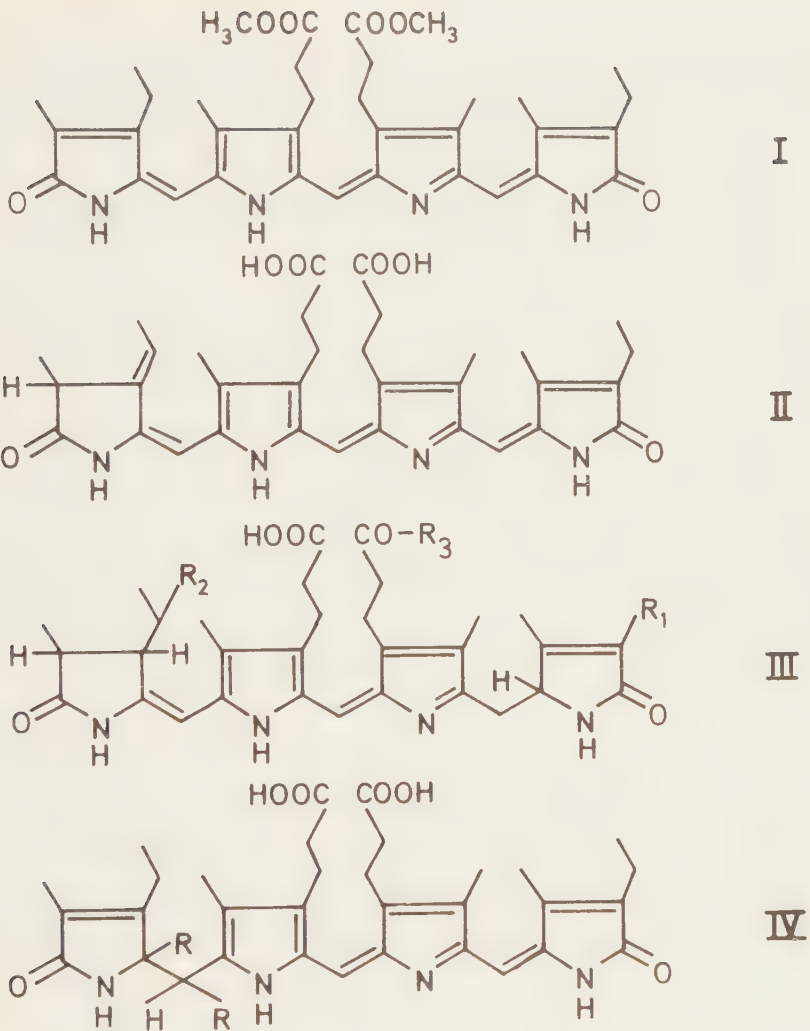


Abb. 18: Strukturformeln von Gallenfarbstoffen und Chromophoren von Biliproteiden

I: Mesobiliverdin-dimethylester; II: Phycobiliverdin;
 IIIa: Mesobilirhodin ($R_1 = \text{CH}_2\text{-CH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$);
 IIIb: Phycoerythrin ($R_1 = \text{CH=CH}_2$, $R_2 = \text{S-Cys-Protein}$,
 $R_3 = \text{Protein}$); IVa: Mesobiliviolin ($R = \text{H}$); IVb: Meso-
 bilipurpurin ($R = \text{OH}$)

hatte in Guanidiniumchloridlösung Maxima bei 543 nm (Schulter bei 520 nm) in neutraler (pH 8,0) bzw. bei 590-595 nm (Schulter bei 560 nm) in saurer Lösung.

4.3. Strukturaufklärung des Phytochrom-Chromophors mittels Chromsäure- und Ammoniakabbau*

Der bisher einzige Strukturvorschlag für den Phytochrom-Chromophor, der auf chemischen Abbauersuchen beruht, stammt von RÜDIGER und CORRELL (109). Bei der Untersuchung von denaturiertem Phytochrom mit der von RÜDIGER (105) entwickelten Methode des Chromsäure- und Chromatabbaues erhielten die Autoren eine Reihe von Imiden als Abbauprodukte, nämlich Methyl-äthyliden-succinimid (V), Methyl-vinyl-maleinimid (VI), Methyl-äthyl-maleinimid (VII), Hämatinsäureimid (VIII) und ein weiteres, nicht identifiziertes, aber ebenfalls als Imid bezeichnetes Abbauprodukt. Spätere Versuche mit nativem Phytochrom (zitiert in Lit. 106) widersprachen diesen Ergebnissen jedoch teilweise, vor allem wurde kein Abbauprodukt aus Ring A der Chromophore erhalten.

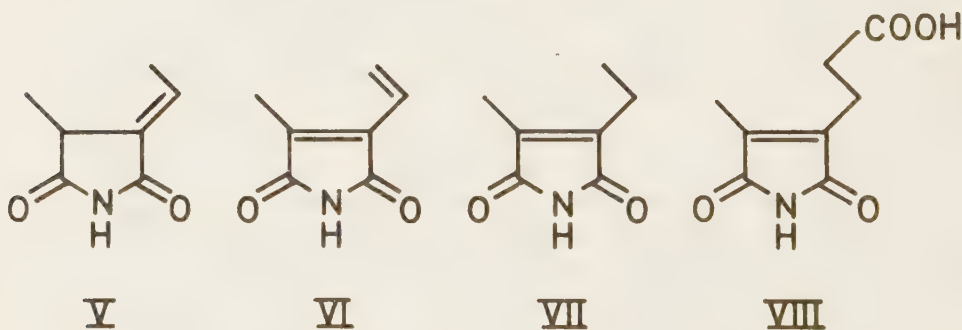


Abb. 19: Abbauprodukte von Biliproteiden nach Chromsäureabbau
 V: Methyl-äthyliden-succinimid; VI: Methyl-vinyl-maleinimid; VII: Methyl-äthyl-maleinimid; VIII: Hämatinsäureimid

In jüngster Zeit wurden wesentliche neue Erkenntnisse über die Struktur der Chromophore von Biliproteiden aus Algen und ihre Bin-

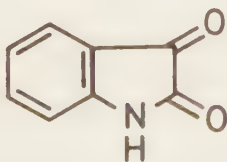
* Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn G.Klein durchgeführt.

dung aus Protein gewonnen. Es wurde gezeigt, daß das Protein (zumindest bei B-Phycoerythrin) über eine Thioätherbindung mit Ring A des Chromophors verknüpft ist (55,56). Diese Bindung läßt sich sowohl durch Chromsäure in der Hitze (hydrolytischer Chromsäureabbau, vgl. Lit. 55,106), schonender jedoch durch Eliminierung in kaltem, verdünntem Ammoniak spalten (114,115), wobei sich das bisher nur schwierig aus Biliproteiden faßbare Methyl-äthyliden-succinimid (V) in guter Ausbeute gewinnen ließ.

Die Kombination des Chromsäureabbaues in der Kälte mit der Eliminierung in verdünntem Ammoniak, beides sehr schonende Methoden, versprach, die Widersprüche in den bisherigen Untersuchungen über die Chromophorstruktur des Phytochroms zu klären.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

In einer ca. 0,8% CrO_3 -Lösung in 1,6 N Schwefelsäure (im folgenden Chromsäure genannt) wurde die vorher bläulich-grüne Phytochromlösung sofort entfärbt. Nach einer Stunde waren die Lösungen durch Chrom-(III)-salze tiefviolett gefärbt. Die nach Zentrifugation von 3 parallel aufgearbeiteten Proben erhaltenen Peptidniederschläge wurden anschließend mit Chromsäure bei 110°C , mit 2 N Ammoniak bei Raumtemperatur oder bei 110°C behandelt. Die nach den Abbauten erhaltenen Lösungen wurden mit Essigester extrahiert, die in den Extrakten enthaltenen Produkte wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und sowohl unter UV-Licht als auch mit Hilfe der Chlor/Benzidin-Reaktion (105) sichtbar gemacht. Ein solches Chromatogramm wird in Abb. 20 gezeigt, zum Vergleich ist ein nach Abbau von Bilirubin erhaltener Extrakt sowie zwei weitere Vergleichssubstanzen (V und IX) mitchromatographiert worden.



IX: Isatin

Beim Chromsäureabbau von Phytochrom bei Raumtemperatur (Abb. 20, Nr.4a) entsteht hiernach nur ein einziges Imid, nämlich das nur wenig vom Startfleck wandernde Hämatinsäureimid (VIII). Daneben



Abb. 20: Dünnschichtchromatographie von Abbauprodukten aus dem Chromsäure- und Ammoniakabbau von Phytochrom und Bilirubin und Vergleichssubstanzen

1: Methyl-äthyliden-succinimid, oben: Z-(cis-)Konfiguration, unten: E-(trans-)Konfiguration; 2: Extrakt nach Chromsäureabbau von Bilirubin bei 25°C, oben: Methyl-vinyl-maleininimid, unten: Hämatinsäureimid; 3: Isatin; 4: Extrakt nach Abbau von Phytochrom in: a: Chromsäure bei 25°C, b: Chromsäure bei 110°C, c: Ammoniak bei 25°C, d: Ammoniak bei 110°C;

Fließmittel: Tetrachlorkohlenstoff/Essigester/Cyclhexan (4:4:1); Schicht: Kieselgel 60 F 254; Anfärbung: Chlor/Benzidin-Reaktion (105)

allerdings findet man ein als gelber Fleck wanderndes Produkt, das nach Chlor/Benzidin-Behandlung eine zwar ähnliche, jedoch im Farbton deutlich andere (graublaue) Anfärbung als die Imide V, VI und VII (tiefblau) hat. Es handelt sich wahrscheinlich um Isatin (IX), das beim Chromsäureabbau von Proteinen häufig aus Tryptophan entsteht (139). Das unbekannte Produkt verhält sich nämlich bei Dünnschichtchromatographie (gleicher R_f -Wert, gleiche Farbe vor [gelb] und nach der Chlor/Benzidin-Reaktion) wie Isatin.

Beim Abbau der nach Chromsäurebehandlung bei Raumtemperatur erhaltenen Peptidniederschläge mit 2 N Ammoniak bei Raumtemperatur (Abb. 20, Nr. 4c) entsteht Methyl-äthyliden-succinimid (V), während beim Chromsäureabbau in der Hitze (Abb. 20, Nr. 4b) stattdessen Hämatinsäureimid (VIII) und ein weiteres, nicht identifiziertes

Produkt, das sich wie die Imide blau anfärben läßt, entsteht. Das gleiche Produkt entsteht neben anderen Produkten (eventuell V) auch beim Abbau des Peptidniederschlages mit 2N Ammoniak in der Hitze (Abb. 20 Nr. 4d).

In keinem Fall wurde beim Abbau des Phytochroms Methyl-vinyl-(VI) oder Methyl-äthyl-maleinimid (VII) gefunden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

4.4.1 Folgerungen aus den Spektralmessungen für die Struktur der Phytochrom-Chromophore

Die durchgeführten Spektralmessungen zeigen eindeutig, daß die Phytochrom-Chromophore in den beiden photoreversiblen Formen unterschiedliche Strukturen haben.

Ein Absorptionsspektrum für den P_{FR} -Chromophor wird jedoch nur bei Denaturierung des nativen P_{FR} im Dunkeln erhalten (Abb. 14); im Licht (Weißlicht oder monochromatisches Licht bei 610 nm) wird denaturiertes P_{FR} quantitativ in denaturiertes P_R umgewandelt (Abb. 15). Bei pH-Werten oberhalb 5 geht der P_{FR} -Chromophor schon im Dunkeln spontan in den P_R -Chromophor (gleiche Absorption und Extinktion) über.

Dies bedeutet, daß der P_{FR} -Chromophor tatsächlich chemisch unterschiedlich vom P_R -Chromophor ist, denn er ist in saurer Lösung im Dunkeln selbst nach Entfaltung der ihn umgebenden Peptidkette stabil. Die thermodynamisch stabilere Struktur hat allerdings der P_R -Chromophor, denn er ist auch bei hohen pH-Werten stabil und Lichtumwandlung ist nur in der Richtung $P_{FR} \longrightarrow P_R$ möglich (Abb. 21).

Während die Phytochrom-Chromophore als Gallenfarbstoffe schon lange identifiziert sind (121) und auch erste Informationen über die Struktur der einzelnen Pyrrolringe vorliegen (106, 109), ist die genaue Struktur von Ring A sowie die Ausdehnung des konjugierten Doppelbindungssystems bisher noch unklar geblieben (106, 108). Dieses Problem wurde nun gelöst, indem die Absorption der P_R - und P_{FR} -Chromophore mit der des Phycocyanin-Chromophors und anderer Gallenfarbstoffe verglichen wurde.

Die Daten von Tab. 10 zeigen die große Ähnlichkeit zwischen P_R - und Phycocyanin-Chromophor. Beide Chromophore unterscheiden sich

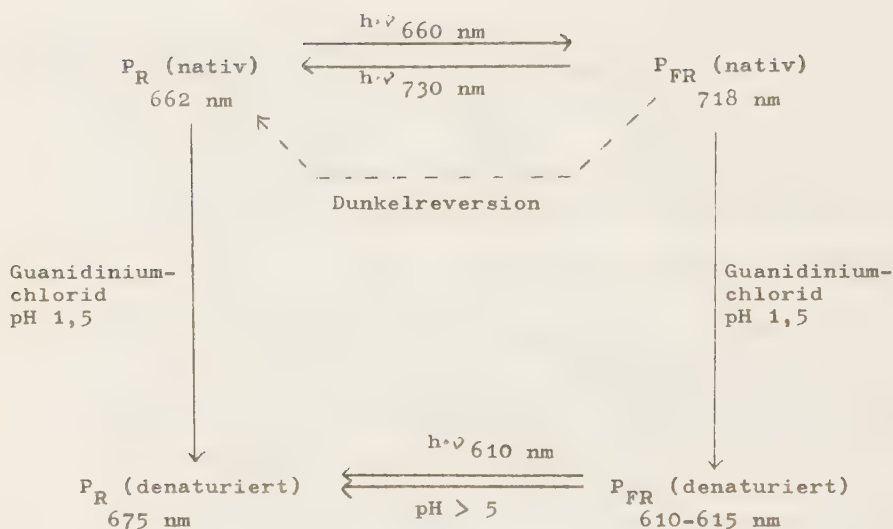


Abb. 21: Umwandlung der beiden Phytochrom-Formen im nativen und denaturierten Zustand; angegeben sind die Hauptabsorptionsmaxima

als Kation, freie Base, Anion und Zn-Komplex nur durch eine um ca. 10 nm zu längeren Wellenlängen verschobene Absorption des P_R . Dies bedeutet, daß beide Chromophore ein grundsätzlich identisches Doppelbindungssystem haben. Ring A muß bei P_R ebenso wie in Phycocyanin hydriert sein (Succinimid-Kern).

Abb. 22 zeigt die Abhängigkeit der Spektraldaten von Gallenfarbstoffen von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen. Man sieht, daß die Absorptionsmaxima von Gallenfarbstoffen um so mehr ins langwellige Gebiet verschoben werden, je größer die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen ist.

Diese Beziehung kann hier zur Absicherung der Chromophorstruktur dienen, so wie dies mit Erfolg schon bei anderen Biliproteiden (54,55) durchgeführt wurde.

Der P_R -Chromophor kann hiernach keine Doppelbindung mehr als der Phycocyanin-Chromophor haben, da die Absorption dann um mindestens 20 nm höher als bei diesem sein müßte. Die nach Abb. 22 für den P_R -Chromophor zutreffende Anzahl an Doppelbindungen von 9,2-9,5 läßt sich durch den Ersatz einer Äthylgruppe (in Phycocyanin) durch eine Vinylgruppe (in P_R) erklären (106,109), wodurch eine geringfügige Verlängerung des chromophoren Systems und damit eine

Pigment	Doppel- bindungen*	Kation (pH < 2)	Base (pH ~ 8)	Anion (pH > 11)	Zink- komplex
P_R					
Phycocyanin	9	675 (620-640)	620-625 (580)	765-770 $\Rightarrow$ 585	650, 590
P_{FR}					
$P_R + K_3[Fe(CN)_6]$		665-670 (630)	612 (590)	760 $\Rightarrow$ 592	640, 590
$PC + K_3[Fe(CN)_6]$		610-615	($\rightarrow P_R$)	($\rightarrow P_R$)	($\rightarrow P_R$)
$PC + Ce^{4+}$		610	?	.	.
$P_{FR} + K_3[Fe(CN)_6]$		600-605 (570)	520-530	760	.
$PC + Mercaptoäthanol$		600-605	570-580, 520-530	760	.
$PC (nativ) + Mercaptoäthanol$		610-615 410-415 ⁵⁾	?	.	.
Mesobiliverdin	11	697 (650)	666	.	687-688 ²⁾
Mesobiliverdin + $K_3[Fe(CN)_6]$		697 (650)	666	.	.
Mesobiliverdin + Ce^{4+}		594 (570) 500	.	.	.
Phycobiliverdin	10	680-685 (640)	.	775 ⁴⁾	673, 628 ²⁾
Phycobiliverdin + $K_3[Fe(CN)_6]$		600 (570-580)	.	.	.
Mesobiliviolin	8	602, 5 ³⁾	565 ³⁾	565 ⁴⁾	628-629 ²⁾
Mesobilipurpurin	8	590-595 (560)	543 (520)	.	.
Phycocerythrin	6	563	507 (593) ²⁾	600-605 ⁴⁾	525, 585 ²⁾
Phycocerythrin + Ce^{4+}		498 (520)	.	.	.
Mesobilirhodin	6	560-565 ²⁾	496 ²⁾	.	584 ²⁾
Urobilin	5	492 ²⁾	448 ²⁾	.	506-508 ²⁾

Zeichen und Abkürzungen: PC = Phycocyanin; * Anzahl der Doppelbindungen im Chromophor einschließlich der gekreuzt konjugierten Doppelbindung in Ring C und der $>C=O$ - Doppelbindungen; [] keine Änderung; ? Spektren ohne Maxima im Bereich 550-800 nm; 1) ohne Guanidiniumchlorid; 2) Lit. 55; 3) Lit. 40; 4) Lit. 111; 5) nur nach vorheriger Zugabe von $K_3[Fe(CN)_6]$

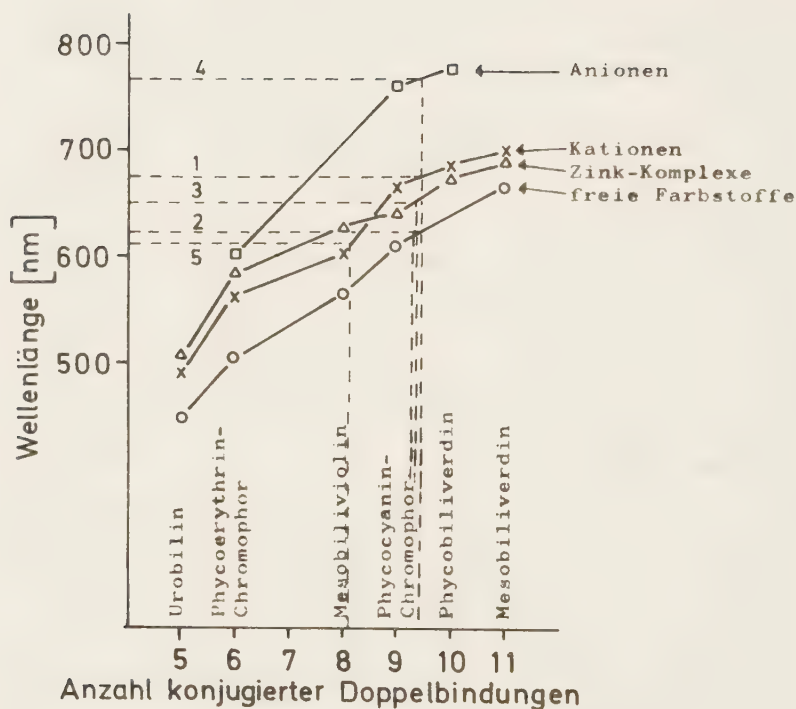


Abb. 22: Abhängigkeit der langwelligen Absorptionsmaxima von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen bei verschiedenen Gallenfarbstoffen (vgl. Tab. 10)

1: P_R -Kation, 2: P_R -freie Base, 3: P_R -Zinkkomplex, 4: P_R -Anion, 5: P_{FR} -Kation

bathochrome Verschiebung des Spektrums bewirkt wird.

Wenn man dies berücksichtigt, kann man die Struktur Xa (Abb. 23) für den P_R -Chromophor aus der Struktur des Phycocyanin-Chromophors (Abb. 23, Xb) ableiten. (Über die Seitenketten der Pyrrolringe und die Bindung an das Protein wird unten berichtet.)

Die prinzipielle Übereinstimmung zwischen den Chromophoren von P_R und Phycocyanin wird weiterhin durch den Vergleich ihrer pK-Werte bestätigt (Kap. 4.2.5.). Die geringe Differenz von 0,3-0,4 pK-Einheiten zwischen beiden Chromophoren kann wieder der Vinylgruppe in P_R zugeschrieben werden, die eine geringe Verlängerung

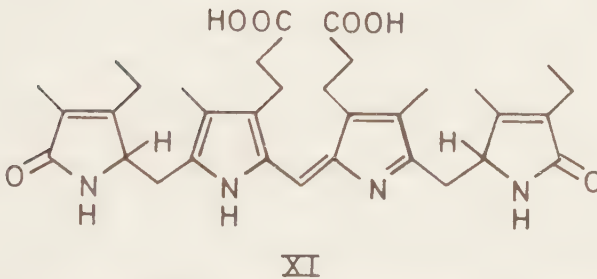
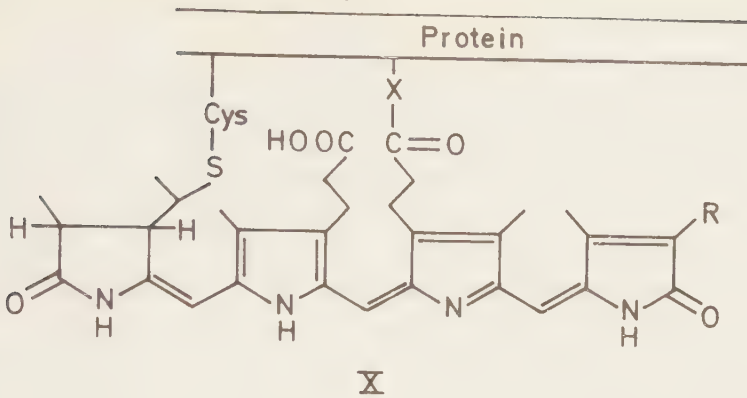


Abb. 23: Strukturformeln von Phytochrom (Xa, $R = CH=CH_2$), Phycocyanin (Xb, $R = CH_2-CH_3$) und Urobilin (XI)

des konjugierten Systems und damit eine etwas größere Azidität von P_R bewirkt.

Zum Vergleich: Mesobiliverdin (Abb. 18, I) hat einen pK-Wert von 3,0 für den Übergang Kation/freie Base, Mesobiliviolin (Abb. 18, IVa) hat einen pK-Wert von 4,0 und Urobilin (Abb. 23, XI) von 7,4 (106). P_R und Phycocyanin können auf Grund ihrer Elektronenspektren (Tab. 10) jedoch nicht zwischen IVa und XI eingeordnet werden. Die Abweichung ihrer pK-Werte von der angegebenen Reihe ist wiederum ein Argument für einen hydrierten Ring A in P_R : Der Phycoerythrin-Chromophor (Abb. 18, IIIb) hat ebenfalls einen im Vergleich zu diesen Verbindungen sehr hohen pK-Wert von 7,3 (H.-P. KÖST und W. RÜDIGER, unveröffentlicht).

Die Veränderungen der Extinktionskoeffizienten bei der Denaturierung von P_R und von Phycocyanin stimmt ebenfalls überein (Kap. 4.2.1. und 4.2.2.). Die Absorption des Chromophor-Kations beträgt bei P_R ca. 48%, bei Phycocyanin ca. 41% des nativen Proteins.

Die Struktur des P_{FR} -Chromophors ist wesentlich anders als die von Phycocyanin und P_R . Das Absorptionsspektrum von P_{FR} als Kation stimmt jedoch gut mit dem von Mesobiliviolin (Abb. 18, IVa) und Mesobilipurpurin (Abb. 18, IVb) überein (Tab. 10), wenn man die zusätzliche Vinylgruppe in Phytochrom berücksichtigt. Das Chromophorsystem von Mesobiliviolin und Mesobilipurpurin ist bezüglich der Ringe B, C und D identisch mit dem des Phycocyanins und von P_R , jedoch fehlt die Doppelbindung zwischen Ring A und B. Das gleiche gilt also auch für P_{FR} ; das bedeutet, daß das Chromophorsystem von P_{FR} um diese Doppelbindung kürzer ist als das von P_R . Der P_{FR} -Chromophor ist jedoch nicht identisch mit Mesobilipurpurin oder Mesobiliviolin, denn keines dieser Pigmente kann durch Licht in eine Verbindung mit den Spektraleigenschaften von P_R umgewandelt werden.

Die langwelligsten Absorptionsmaxima von nativem P_R sowie von Allophycocyanin und C-Phycocerythrin stimmen gut mit dem des Kations, das von nativem C-Phycocyanin dagegen mit dem der freien Base des jeweiligen Chromophors überein. Möglicherweise liegt der Chromophor von P_R , Allophycocyanin und C-Phycocerythrin also in saurer Umgebung, der von C-Phycocyanin aber in neutraler Umgebung im Protein vor. Falls diese Annahme richtig ist, spricht das langwellige Absorptionsmaximum des P_{FR} (718-725 nm) dafür, daß der Chromophor als Anion vorliegt.

Die genaue Strukturaufklärung des P_{FR} -Chromophors wird durch seine spontane Umwandlung bei höheren pH-Werten behindert. Die Versuche, bei denen P_R und andere Gallenfarbstoffe mit Oxydationsmitteln behandelt wurden, zeigen jedoch, daß tatsächlich die Doppelbindung zwischen Ring A und B bei der Phototransformation von P_R in P_{FR} verschwindet.

Diese Methinbrücke wird durch Hexacyanoferrat-(III) selektiv in saurer Lösung oxydiert, falls der Chromophor auf der einen Seite (Ringe B, C und D) voll durchkonjugiert ist und Ring A hydriert ist. Aus denaturiertem P_R und Phycocyanin sowie aus Phycobiliverdin erhält man in schneller Reaktion das Kation von Mesobilipurpurin (Abb. 18, IVb).

Mesobiliverdin (voll durchkonjugiertes System) und der Phycocerythrinchromophor (keine Methin-Brücke zwischen Ring C und D) werden von Hexacyanoferrat-(III) nicht angegriffen, wohl aber von dem stärkeren Oxydationsmittel Cer-(IV)-sulfat, wobei Mesobilipurpurin aus Mesobiliverdin und ein Produkt mit dem Chromophor des Urobilins

(Abb. 23, XI) aus Phycoerythrin entsteht. Dies spricht wiederum für Struktur Xa (Abb. 23) für den P_R -Chromophor.

P_{FR} dagegen wird durch Hexacyanoferrat-(III) nicht verändert. Das bedeutet, daß die Methin-Doppelbindung, die in P_R zwischen Ring A und B ist, schon verschwunden ist.

Für die Form, in der diese Doppelbindung spektral unwirksam gemacht wird, sind folgende Möglichkeiten denkbar:

1) Die Doppelbindung wird nicht chemisch angegriffen, sondern nur durch Isomerisierung des Moleküls spektral unwirksam gemacht. Dies könnte z.B. durch Herausdrehen der Doppelbindung aus der Ebene des restlichen Chromophorsystems geschehen, wodurch das konjugierte System verkürzt wird.

2) Die Methin-Brücke wird chemisch verändert:

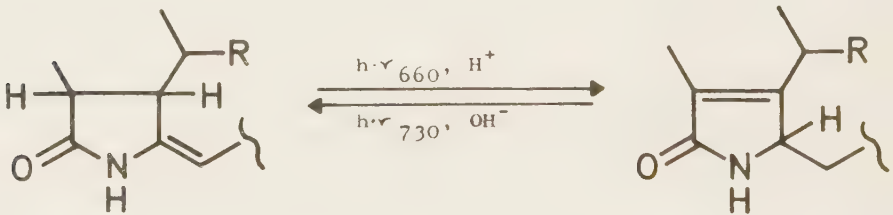
- a) durch Isomerisierung ähnlich der Mesobilirhodin-Urobilin-Umlagerung;
- b) durch Photooxydation der Doppelbindung unter Bildung einer Glykolgruppierung oder einer Carbonylfunktion am Brücken-C-Atom;
- c) durch Reduktion zu einer Methylengruppe;
- d) durch Addition eines Substrats an die Doppelbindung.

Die aufgeführten Reaktionsmöglichkeiten können über mehrere Zwischenstufen ablaufen, wobei z.B. Radikale oder andere instabile Zwischenprodukte entstehen können. Diese Zwischenstufen entsprächen dann den bei der Phototransformation von nativem Phytochrom nachgewiesenen instabilen Formen (65,128). In jedem Fall muß gefordert werden, daß das nach der Phototransformation gebildete Primärprodukt durch eine anschließende Konformationsänderung des Apoproteins in seiner Struktur stabilisiert wird.

Für und gegen jede der aufgeführten Möglichkeiten für die Art des Verschwindens der Doppelbindung zwischen Ring A und B kann man Argumente aufführen:

- 1) Eine cis-trans-Isomerisierung des Phytochrom-Chromophors bei der Phototransformation wurde schon von HENDRICKS und SIEGELMAN (46) postuliert, jedoch fehlten bisher experimentelle Hinweise für diese Annahme. Kürzlich allerdings wurde von Metallkomplexen des Biliverdins berichtet (34), die in dieser Art isomerisieren und entweder in einer cyclischen, nahezu planaren "phlorinartigen" Konformation mit einem Absorptionsmaximum bei 800-900 nm oder in einer offenkettigen "bilatrienartigen" Form vorliegen sollen, die bei 650-700 nm absorbiert. Durch Titration mit starkem Alkali ließ

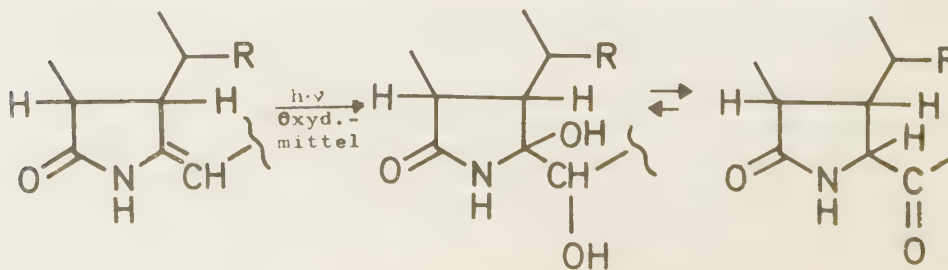
sich eine Umwandlung des Nickelkomplexes aus der offenen ($\lambda_{\text{Max}} = 670 \text{ nm}$) in die "phlorinartige" Form ($\lambda_{\text{Max}} = 780 \text{ nm}$) bewirken. Dies könnte ein Modell für die Photoreaktion bei Phytochrom sein, wenn auch das Phytochrom sicher nicht als Metallkomplex vorliegt. Die Stabilität von denaturiertem P_{FR} als Kation macht das Vorliegen einer "phlorinartigen" Struktur jedoch sehr unwahrscheinlich. 2a) Die Umlagerung von Mesobilirrhodin in Urobilin in saurer Lösung ist ein Beispiel für die Isomerisierung eines Pigments unter Verkürzung des chromophoren Systems (55). Bei P_{R} könnte diese Isomerisierung durch Licht induziert und durch die möglicherweise saure Umgebung des Chromophors (vgl. vorn) begünstigt werden (zum Mechanismus vgl. Lit. 55).



Die entgegengesetzte Reaktion, die durch Alkali bewirkte Verlängerung des chromophoren Systems (z.B. die Umlagerung von Urobilin in Mesobilirrhodin) ist ebenfalls bekannt (110). Für eine Umlagerung des P_{FR} -Chromophors in dieser Weise spricht seine spontane Umwandlung bei pH-Werten >5 ; im nativen Protein könnte die Reaktion durch Licht induziert und durch eine stark alkalische Umgebung des Chromophors begünstigt werden.

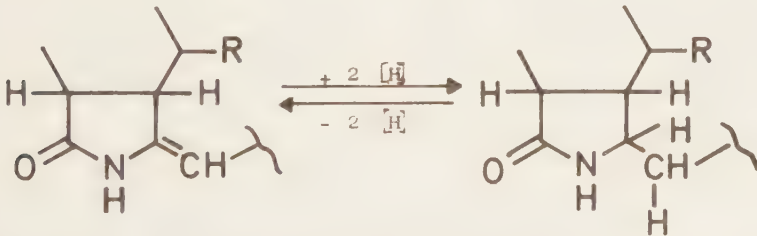
Das bedeutet, daß sich mit der Phototransformation die Azidität der Chromophorumgebung jeweils ändern muß.

2b) Die Oxydation der Methinbrücke unter Bildung einer Carbonyl- oder Glykolgruppe ist nicht nur, wie es in Kap. 4.2.6. und 4.2.8. beschrieben wurde, mit chemischen Oxydationsmitteln möglich, son-



dern ebenso nach Anregung des Moleküls durch Licht und anschließende spontane Oxydation mit Luftsauerstoff. Hierzu reicht auch die Energie von langwelligem Licht aus, wie H. SCHEER (persönl. Mitteilung) bei Versuchen an Modells-substanzen feststellte. Die Rückreaktion, also die spontane Reduktion des entstandenen Produktes, die bei Belichtung des denaturierten Chromophors ablaufen müßte, erscheint jedoch relativ unwahrscheinlich.

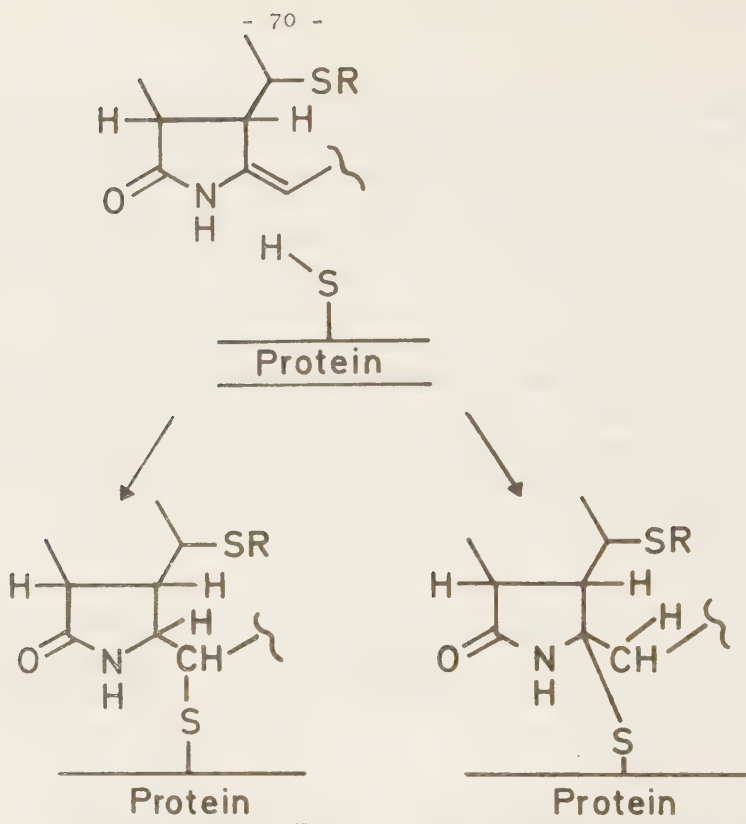
2c) Reduktionsmittel wie Hexacyanoferrat-(II), Cystein und β -Mercaptoäthylamin können einen Hellroteffekt, Oxydationsmittel hingegen können einen Dunkelroteffekt hervorrufen oder additiv zu einer entsprechenden Bestrahlung wirken (53). Dies spricht für die Reduktion (Hydrierung) des P_R zu P_{FR} während der Phototransformation, während die Rückreaktion mit einer Oxydation (Dehydrierung) gekoppelt wäre.



Falls diese Redoxreaktionen nicht am Apoprotein, sondern am Chromophor ablaufen, könnte dies z.B. durch Hydrierung der Doppelbindung an Ring A mit Hilfe von freien Cysteinresten aus dem Apoprotein, die zu Cystin oxydiert werden, ablaufen. Auch die Rückreaktion, die Dehydrierung des P_{FR} unter gleichzeitiger Reduktion des Cystins, ist leicht vorstellbar. Allerdings konnte nach Denaturieren von P_R durch Zusatz von Reduktionsmitteln keine Spektralveränderung, auch nicht bei zusätzlicher Belichtung, beobachtet werden.

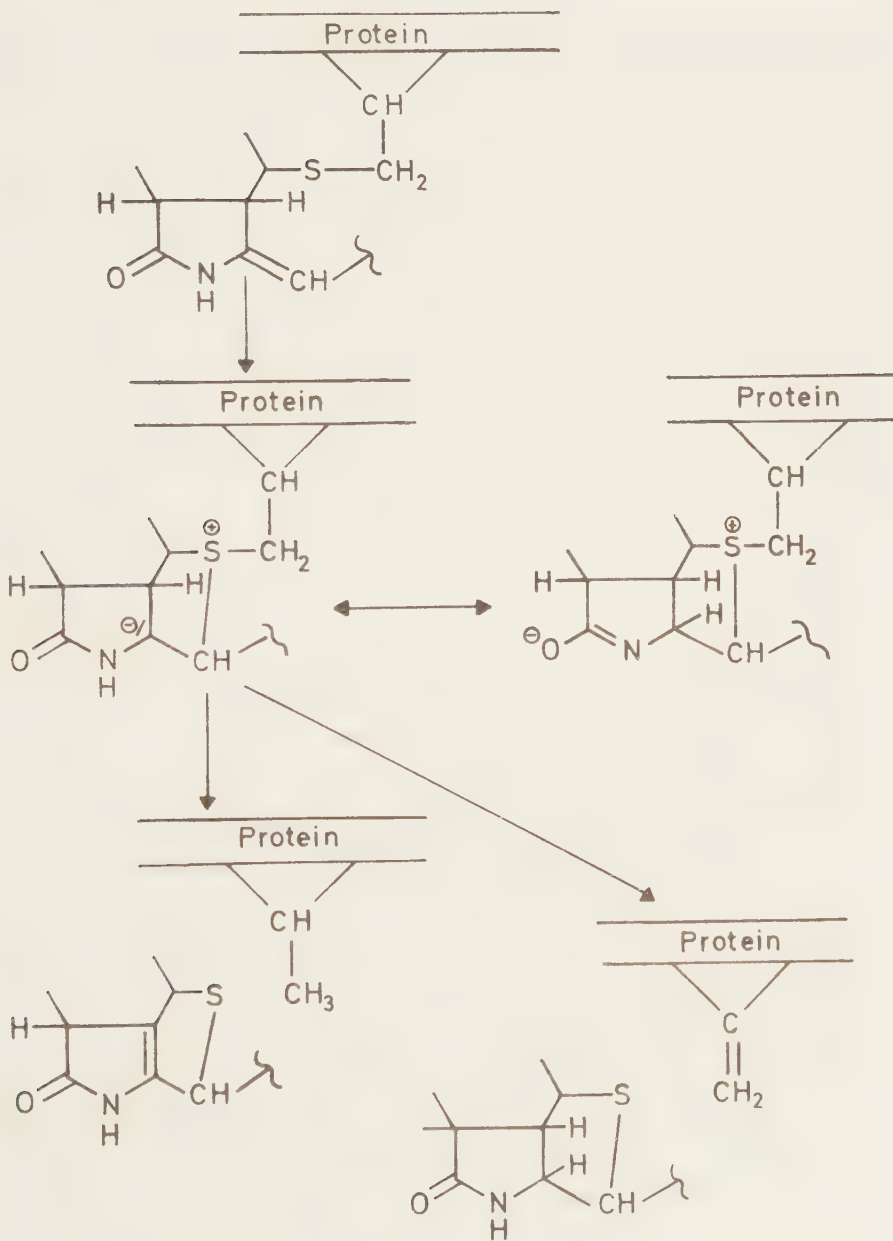
2d) Die Addition eines Substrats H-X, z.B. eines Cysteinrestes aus dem Apoprotein, kann in folgender Weise ablaufen, je nachdem ob ein radikalischer (Licht!) oder ein ionischer Mechanismus zugrunde liegt:(siehe Abb. auf Seite 70 oben).

Das entstandene Addukt muß sehr energiereich sein, da die Rückreaktion, d.h. die Eliminierung des Substrates, im denaturierten Pigment bei Belichtung spontan erfolgt. Die Beobachtung, daß die Eliminierung bei hohen pH-Werten begünstigt ist, steht im Einklang mit dieser Annahme.



Für die Addition kommt sowohl das an Ring A gebundene Cystein als auch eine weiter vom Chromophor entfernte Gruppe in Frage. Die Addition des an Ring A gebundenen Cysteins (vgl. Kap. 4.4.2.) unter Bildung eines 5-Rings könnte z.B. unter Abspaltung des Proteinrestes oder Ausbildung einer ionischen Struktur ablaufen (siehe Abb. auf S.71). Wahrscheinlicher ist jedoch die Addition eines weiter vom Chromophor entfernten Restes der Peptidkette, da das Phycocyanin keine Phototransformation zeigt, obwohl es genauso wie P_R an Ring A über Cystein mit dem Protein verknüpft ist (vgl. Lit. 55,56).

Die reversible Änderung des Phycocyanin-Spektrums (natives und denaturiertes Pigment, vgl. Kap. 4.2.7.) bei Zugabe von Mercaptoäthanol kann möglicherweise als Modellreaktion angesehen werden, wenn auch hier wahrscheinlich eine Addition des Mercaptoäthanol an die mittlere Methinbrücke zu einem Bilen-(a)-Chromophor ($\lambda_{\text{Max}} = 400 \text{ nm}$ als freie Base, Lit. 27) erfolgte. Die Addition könnte jedoch im nativen Phytochrom aus sterischen Gründen an der Doppelbindung neben Ring A begünstigt sein. Bei anderen Pigmenten kann



die Addition einer geeigneten Seitenkette aus dem Apoprotein aus sterischen Gründen vollständig verhindert sein, so daß sie keine der Phototransformation von Phytochrom ähnliche Reaktion zeigen. Es ist klar, daß nach den vorliegenden Versuchsergebnissen eine Entscheidung darüber, welche Reaktion bei der Phototransformation abläuft, noch nicht getroffen werden kann. Nach den eben dargelegten Überlegungen dürfte aber eine bloße Konfigurationsänderung des Chromophors ebenso wie eine Oxydation oder eine Reduktion der Methinbrücke zwischen Ring A und B unwahrscheinlich sein. Eine Isomerisierung des Chromophors nach Art der Urobilin-Mesobilirhodin-Umlagerung (55,110) oder eine Addition eines Substrats läßt sich jedoch leicht mit den bisher vorliegenden Daten vereinbaren. Zusätzlich zur Veränderung der Chromophorstruktur kann mit der Phototransformation noch eine weitere Reaktion ablaufen, für die die Spektraldaten des nativen Pigments sprechen: Das Apoprotein führt zu einer drastischen bathochromen Verschiebung der Chromophorabsorption von P_{FR} (von 615 nm als Kation nach 718-720 nm im nativen Proteid), während der P_R -Chromophor weitgehend unverändert bleibt (675 nm als Kation, 662 nm im nativen Pigment). Diese Verschiebung der P_{FR} -Chromophorabsorption kann mit der Bildung eines Anions erklärt werden, das durch das Apoprotein stabilisiert wird. Diese von RÜDIGER (108,109) diskutierte Möglichkeit steht mit den bekannten Daten in guter Übereinstimmung (vgl. S. 66).

4.4.2. Folgerungen aus den Abbauprobungen an Phytochrom für die Chromophorstruktur und seine Bindung an das Protein

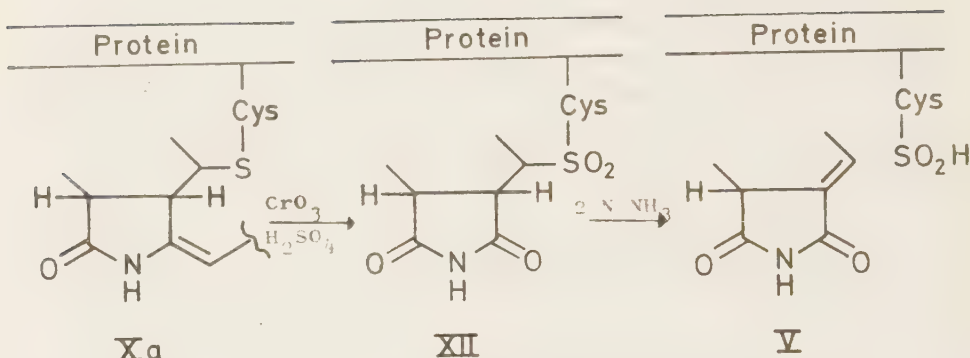
Nach Chromsäureabbau und anschließender Eliminierung des Apoproteins in 2 N Ammoniak (beides bei Raumtemperatur) konnte erstmals das bisher unbekannte Imid aus Ring A des Phytochrom-Chromophors (P_R) als Methyl-äthyliden-succinimid (V) identifiziert werden. Dies beweist den aus den Spektralmessungen (Kap. 4.2., Diskussion in Kap. 4.4.1.) abgeleiteten Schluß, daß Ring A einen gesättigten Pyrrolring hat. Gleichzeitig wird wahrscheinlich gemacht, daß der P_R -Chromophor ebenso wie die Chromophore der Biliproteide aus Algen (55,56) über eine Thioätherbindung (aus Cystein) ans Apoprotein gebunden ist. Auch die restliche Struktur des Phytochromchromophors stimmt weitgehend mit der vom Phycocyaninchromophor bekannten überein.

Der Chromsäureabbau von Biliproteiden in der Kälte setzt nur die nicht ans Protein gebundenen Pyrrolringe als Imide frei (108,111). Aus Phytochrom wurde hier als einziges Imid Hämatinsäureimid (VIII) identifiziert. Methyl-äthyliden-succinimid (V) ist nicht im Extrakt (Abb. 20, Nr. 4a) enthalten, dafür jedoch Isatin (IX), das durch Oxydation von Tryptophan oder Indolelessigsäure, die vermutlich in Fremdproteinen enthalten waren, entsteht (139). Isatin (IX) läuft bei Dünnschichtchromatographie nur wenig langsamer als Methyl-äthyliden-succinimid (V) (vgl. Abb. 20) und konnte von diesem erst nach Verwendung von neu entwickelten DC-Platten (Fa. Merck) statt selbst hergestellter DC-Platten getrennt werden. Es ist daher anzunehmen, daß das von RÜDIGER und CORRELL (109) beim Abbau von denaturiertem Phytochrom erhaltene und als Methyl-äthyliden-succinimid angesprochene Produkt in Wirklichkeit Isatin war. Aus besser gereinigtem, nativem Phytochrom wurde bisher (106,108) weder Isatin noch Methyl-äthyliden-succinimid nachgewiesen.

Nach Behandlung des Peptidrückstandes mit 2 N Ammoniak in der Kälte wurde Methyl-äthyliden-succinimid (V) eindeutig nachgewiesen. Die erhaltenen Mengen entsprechen den unter gleichen Bedingungen aus Phycocyanin erhaltenen Mengen an V (G. KLEIN, persönl. Mitteilung, vgl. Lit. 114,115). Das erhaltene Produkt hat einen höheren R_f -Wert und eine intensivere Blaufärbung nach der Chlor/Benzidin-Reaktion als Isatin.

Damit ist nachgewiesen, daß der Phytochrom-Chromophor über einen Pyrrolring ans Apoprotein gebunden war, der nach Chromsäureabbau und Ammoniakbehandlung V ergibt. Das gleiche trifft für die Biliproteide aus Algen zu (55,56,111,114,115); daher ist zu vermuten, daß auch das Phytochrom wie diese eine Bindung über Cystein zwischen Chromophor und Protein hat. SCHOCH et al. (114,115) konnten den Mechanismus der bei der Eliminierung mit Ammoniak (nach Chromsäurebehandlung) ablaufenden Reaktionen an Modells-substanzen aufklären. In Analogie hierzu ergaben sich für das Phytochrom folgende Reaktionen: siehe S. 74 oben.

Beim Chromsäureabbau bei Raumtemperatur wird die Bindung zwischen allen 4 Pyrrolringen gelöst, und es bilden sich die Imide (105). Gleichzeitig wird die Thioätherbrücke zwischen Imid und Protein zu einem Sulfon (XII) oxydiert. 2 N Ammoniak spaltet diese Bindung anschließend, wobei sich eine neue Doppelbindung ausbildet und somit Methyl-äthyliden-succinimid (V) freiwird. Abb. 20 zeigt, daß

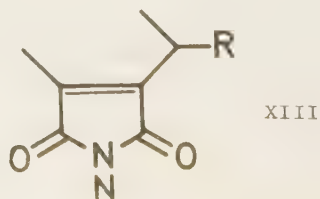


es sich um die trans-Form (E-Konfiguration) handelt.

Eine Bindung des Proteins über andere Gruppen an Ring A ist sehr unwahrscheinlich, da von SCHOCH und LINSSENMEIER (unveröffentlicht) gezeigt wurde, daß andere Liganden (z.B. -O-R statt -S-R) nicht zu V eliminieren. Auch eine Bindung direkt am Kern des Pyrrolringes scheidet aus, da dann Methyl-äthyl-maleinimid (VII) statt V entstehen müßte (114).

Bei saurer Hydrolyse eines nach Pepsin-Abbau erhaltenen Phytochrom-Peptidfragments erhielten FRY und MUMFORD (33) zwar sowohl Cystein als auch Serin, jedoch halten sie eine Bindung des Chromophors über Serin für unwahrscheinlich und postulieren stattdessen eine Thioätherbindung über Cystein. Unsere Versuche bestätigen jetzt diese Vermutung.

Die Hydrolyse des Peptidrückstandes in Chromsäure bei 110°C setzt ein weiteres, vorher ans Protein gebundenes Imid, nämlich Hämatinsäureimid (VIII) frei. Die Ausbeute ist etwa identisch mit der vorher schon in der Kälte freigesetzten Menge an VIII. Daneben entsteht ein weiteres Abbauprodukt, das sich durch die Anfärbung als Imid zu erkennen gibt. Es hat einen R_f -Wert, der zwischen dem von Methyl-äthyliden-succinimid (V) und dem von Methyl-vinyl-maleinimid (VI) liegt. Es kann daher als substituiertes Maleinimid (XIII) angesprochen werden, zumal es unter UV-Licht wie diese Fluoreszenzlöschung zeigt.



Ein ähnliches Produkt wurde schon früher (109) nach Abbau von denaturiertem Phytochrom beschrieben, aus reinem, nativem Phytochrom wurde stattdessen Methyl-vinyl-maleinimid (VI) isoliert (106,108). Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei XIII um ein während der Abbauversuche gebildetes Artefakt handelt, das durch Reaktion einer ursprünglich freien Vinylgruppe des Chromophors (Ring D) mit dem im Überschuß (90% gegenüber 10% Phytochrom) vorhandenen Fremdprotein entsteht. Ähnliche Reaktionen sind in der Chemie der Gallenfarbstoffe weit verbreitet (Lit. 108 und 106, dort z.B. S. 107). Außerdem ist bekannt, daß VI sehr leicht oxydativ zerstört wird, so daß stets erheblich geringere Ausbeuten erhalten werden, als nach seinem Anteil am Chromophor eigentlich zu erwarten wäre (55,105).

Der Abbau mit Ammoniak in der Hitze (Abb. 20, Nr.4d) liefert neben geringen Mengen an V nur das unbekannte Imid XIII, das auch beim CrO_3 -Abbau in der Hitze entsteht, Hämatinsäureimid dagegen entsteht nicht. Dies macht es wahrscheinlich, daß dieser Pyrrolring, der nur durch Säurehydrolyse erhalten wird, über eine Carbonamidbindung und nicht über eine Esterbindung mit dem Protein verknüpft ist, da eine Esterbindung in wäßrigem Ammoniak teilweise zur Säure hydrolysiert werden müßte.

Damit ist gesichert, daß der Phytochrom-Chromophor (P_R) über mindestens 2 Pyrrolringe mit dem Protein verknüpft ist, während mindestens ein weiterer Ring, wahrscheinlich aber 2 weitere Ringe, frei sind. In Analogie zur Struktur anderer Biliproteide (106) darf man annehmen, daß die Ringe A und C gebunden sind und daß Ring B und D frei sind.

Die Ergebnisse der Abbauversuche stimmen gut mit denen der Spektralmessungen (Kap. 4.2.) überein. Lediglich die Struktur von Ring D ist nicht ganz geklärt. Während die Spektralmessungen zu der Annahme eines im nativen Protein freien Vinylsubstituenten an Ring D führen, ergeben die Abbauversuche einen anderen Substituenten, der aber ein aus der Vinylgruppe entstandenes Artefakt sein dürfte.

Die wahrscheinlichste Struktur für den P_R -Chromophor ist demnach Struktur **Xa** (Abb. 23).

5. Untersuchungen zur Bindung von Phytochrom an Zellpartikel

5.1. Überblick über bisherige Untersuchungen zur Partikelbindung des Phytochroms und seine Lokalisierung in der Zelle

Eine Reihe wesentlicher Phytochrom-gesteuerter Effekte, die man auch unter dem Begriff der "schnellen Phytochromreaktionen" zusammenfaßt (Tab. 11), lassen sich mit Hilfe der Theorie der Phytochrom-induzierten "differentiellen Genaktivierung (73,75) nicht befriedigend erklären. Vielmehr werden die in Tab. 11 aufgezählten Effekte auf Änderungen von Membraneigenschaften zurückgeführt, die nach Ansicht vieler Autoren (vgl. Literaturangaben in Tab. 11, Zusammenfassung in Lit. 13, 124) eine frühe Folge der Phototransformation von P_R zu P_{FR} sind. Ein Modell für den Mechanismus einer Phytochrom-Membran-Wechselwirkung und die Auslösung von photomorphogenetischen Prozessen als Folge davon wurde von SMITH (124) ausgearbeitet.

Tab. 11: Schnelle Phytochromreaktionen (Auswahl)

- a) Adhäsion von Wurzelspitzen an negativ geladene Glasoberflächen (129,130)
- b) Veränderungen im bioelektrischen Potential von Haferkoleoptilen (81)
- c) Blühhemmung bei *Pharbitis nil* (32,80)
- d) Mit Ionentransport verbundene nyktinastische Blattbewegungen bei *Albizzia julibrissin* (112)
- e) Schließen der Blätter bei *Mimosa pudica* (31)
- f) Entfaltung von Getreideblättern (133)

Konkrete Hinweise für das Vorliegen einer direkte Assoziation zwischen Phytochrom und Zellmembranen lieferten Versuche zur Lokalisierung des Phytochroms in der Zelle: Genaue Untersuchungen des Polarotropismus bei *Dryopteris* durch ETZOLD (29), die Experimente von HAUPT und Mitarbeitern (41,43) zur Chloroplastendrehung bei der Grünalge *Mougeotia* mit Hilfe von polarisierten Mikrostrahlen sowie die Versuche von MARME und SCHÄFER (71) zur Lokalisierung und Orientierung von Phytochrom in Maiskoleoptilen legten den Schluß nahe, daß mindestens ein Teil des Phytochroms nahe bei oder im Plasmalemma selbst lokalisiert ist.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer partikulären Phytochromfraktion gaben RUBINSTEIN et al. (102), die 4% des gesamten extrahierbaren Phytochroms aus Hafer nach Zentrifugation bei 40.000 g im Niederschlag fanden.

Später fanden mehrere Autoren (6,69,70,95) bei Versuchen mit Kürbis Hinweise für eine spezifische Bindung von Phytochrom an eine partikuläre Zellfraktion. Nach Bestrahlung mit Hellrotlicht stieg der Anteil des durch Zentrifugation sedimentierbaren Phytochroms bei Gegenwart von 10 mM Mg^{2+} im Extraktionspuffer auf über 40% des gesamten extrahierbaren Phytochroms, d.h. um den Faktor 10, an (6,70). Bei noch höheren Mg^{2+} -Konzentrationen (20-50 mM) ging Phytochrom wieder in Lösung, obwohl die Aggregation von Zellbestandteilen noch verstärkt auftrat.

An Hand dieser Befunde ließ sich ein Modell für die Membranbindung von Phytochrom und Umwandlungen von P-bindenden Membranbestandteilen unter dem Einfluß von Phytochrom aufstellen (6,95,96), das auf den Vorstellungen von CHANGEUX et al. (21) über molekulare Wechselwirkungen auf der Ebene von Membranen beruht, und mit dessen Hilfe sich viele der oben aufgeführten schnellen Phytochromreaktionen erklären lassen.

Im Verhalten von Phytochrom aus Kürbis und Mais zeigten sich aber teilweise erhebliche Unterschiede, so unter anderem beim Bindungsverhalten nach Rot- und anschließender Dunkelrotbelichtung (6,69,70,95). Es stellte sich deshalb die Frage, inwieweit die Partikelbindung von Phytochrom tatsächlich ein bei allen Pflanzen verbreitetes Phänomen ist und damit möglicherweise einen physiologisch wirksamen Vorgang darstellt.

Außerdem schien es sinnvoll zu untersuchen, ob die von MARME et al. (69) angegebene Methode zur Reinigung von kleinen Phytochrommengen aus etiolierten Kürbishaken sich für die Gewinnung größerer Mengen Phytochrom aus Haferkeimlingen eignet.

5.2. In-vitro-Bindung von Phytochrom an eine partikuläre Zellfraktion

5.2.1. Kürbis

Die Methode zur Isolierung von Phytochrom durch spezifische Bindung an eine partikuläre Zellfraktion soll zunächst an Hand von Versuchen mit Kürbishaken erläutert werden. Die Extraktion er-

folgte nach dem in Abb. 24 angegebenen Schema (zur Arbeitstechnik vgl. Lit. 69,70).

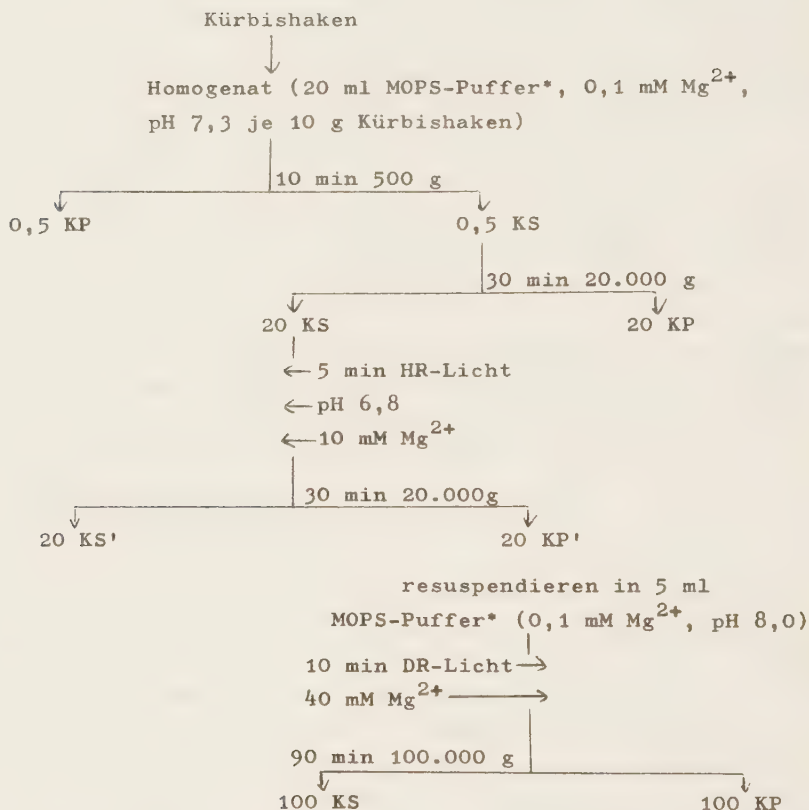


Abb. 24: Isolierung von partikelgebundenem Phytochrom aus Kürbis (in-vitro-Induktion der Bindung)

* MOPS-Puffer: 25 mM MOPS, 3 mM EDTA, 3% Saccharose, 0,1 mM MgCl_2 , 14 mM 2-Mercaptoäthanol

Im Verlauf der Extraktion nach Abb. 24 bleibt das im Homogenat (Mg^{2+} -Konzentration: 0,1 mM) enthaltene Phytochrom während der Zentrifugationen bei 500 g und 20.000 g im Überstand (0,5 KS und 20 KS) und wird dabei von Zellfragmenten (0,5 KP) und dem größten Teil der Zellorganellen (20 KP) abgetrennt. Nach Induktion der Phytochrombindung (HR-Licht, pH 6,8) an die bei der Zugabe von

Magnesium-Ionen gebildeten Vesikel findet man das Phytochrom zu ~70% im Niederschlag 20 KP' der Zentrifugation bei 20.000 g. Nach Resuspendieren des Niederschlags und Ablösen des Phytochroms von der Membran (Puffer mit $c_{Mg^{2+}} = 0,1 \text{ mM}$; DR-Licht; pH 8,0) wird die Lösung wieder auf eine Mg^{2+} -Konzentration von 40 mM gebracht. Beim anschließenden Zentrifugieren bleibt das Phytochrom zu über 70% im Überstand 100 KS, nur ~30% werden zusammen mit dem Großteil der Membranpartikel, an die Phytochrom vorher gebunden war, sedimentiert (Tab. 12).

Tab. 12: in-vitro-Partikelbindung bei Kürbis: Verteilung des Phytochroms auf die Sedimente und die Überstände der Zentrifugationen (vgl. Abb. 24)

Bedingungen	Fraktion	relativer P-Anteil	Ausbeute*
10 mM Mg^{2+} , 5 min HR, pH 6,8	20 KS' 20 KP'	28% 72%	} 100 %
40 mM Mg^{2+} , 10 min DR, pH 8,0	100 KS 100 KP	73% 27%	

* unberücksichtigt blieben eventuelle Verluste bei den ersten Zentrifugationen

Auf diese Weise wurde eine sehr gute und relativ einfache Reinigung des Phytochroms erreicht (nach MARME, Lit. 68, wird ein Reinigungsfaktor von 400 bezogen auf das Gesamtprotein erreicht). Für eine Reinigung von Phytochrom in größeren Mengen ist Kürbis jedoch ungeeignet:

- 1) Die Ernte ist sehr mühsam und zeitraubend, da die Keimlinge einzeln abgeschnitten werden müssen (für die Ernte von 50 g Kürbishaken benötigt eine Person etwa 3 Stunden).
- 2) Extrakte aus Kürbis enthalten sehr viele Lipide, die die Aufarbeitung erschweren.
- 3) Kürbissamen ist im Vergleich zu anderem Saatgut (z.B. Hafer) sehr teuer.

5.2.2. Hafer

Zunächst wurde versucht, die für Kürbishaken beschriebene Methode

zur in-vitro-Bindung von Phytochrom an eine Partikelfraktion auf Hafer zu übertragen. Die Versuche, die nach einer gegenüber Abb. 24 (Kürbis) etwas veränderten Methode durchgeführt wurden, lieferten folgende Daten (Tab. 13):

Tab. 13: Versuche zur in-vitro-Partikelbindung von Phytochrom bei Hafer (Induktion nach Zentrifugation bei 10.000 g) Methode: vgl. Abb. 24, jedoch: Extraktion in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, 3% Saccharose, 14 mM 2-Mercaptoäthanol; Zentrifugation: 15 min 500 g, dann 30 min 10.000 g; Mg^{2+} -Zugabe und HR-Belichtung des 10 KS; erneute Zentrifugation 30 min 50.000 g

Zentrifugation bei	$c_{Mg^{2+}}$ [mM]	Anteil gebundenes P_{FR} im 10 KP	Anteil P_{FR} in 10 KP + 50 KP*
10.000 g	0	4,1%	.
50.000 g	0	2,0%	6,0%
	5	2,7%	6,7%
	10	2,3%	6,3%
	20	4,6%	8,5%
	48	4,9%	8,8%
	91	5,0%	8,9%

* Anteil des nach Zentrifugation bei 10.000 g und 50.000 g sedimentierten Phytochroms (10 KP + 50 KP) am gesamten extrahierten Phytochrom (10 KS + 10 KP)

In Tab. 13 und in den folgenden Teilen von Kap. 5 wird das nach den einzelnen Zentrifugationen erhaltene Phytochrom eingeteilt in:
 "lösliches Phytochrom": nach Zentrifugation im Überstand befindliches Phytochrom,
 "gebundenes Phytochrom": nach Zentrifugation im Sediment befindliches Phytochrom.

Der Anteil an gebundenem Phytochrom nach einer Zentrifugation wird berechnet nach:

$$\% \text{ gebundenes } P = \frac{P\text{-Einheiten im Überstand}}{P\text{-Einh. im Überstand} + P\text{-Einh. im Sediment}} \times 100$$

Die Menge an Phytochrom (Tab. 13), die sich nach Zentrifugation eines Hafer-Extraktes bei 10.000 g durch Mg^{2+} -Zugabe und HR-Belichtung sedimentieren läßt, steigt also in geringem Maße bei steigender Mg^{2+} -Menge an, bleibt aber insgesamt nur sehr gering

(2-5% des noch vorhandenen Phytochroms). Dies ist nicht mehr als auch bei Abwesenheit von Mg^{2+} und ohne HR-Belichtung allein durch Zentrifugation bei 10.000 g sedimentiert wird.

Nachdem der Versuch einer Induktion der Phytochrom-Bindung nach Zentrifugation bei 10.000 g fehlschlug, wurde untersucht, ob das erwünschte Ziel nach der Vorzentrifugation bei 500 g erreicht werden konnte. Damit sollte vermieden werden, daß zu einer Phytochrom-Bindung nötige Partikel schon bei 10.000 g abzentrifugiert wurden.

Tab. 14: Versuche zur in-vitro-Partikelbindung von Phytochrom in Hafer-Extrakten (Mg^{2+} -Zugabe und HR-Belichtung nach Zentrifugation bei 500 g, dann Zentrifugation bei 20.000 g, sonst wie Abb. 24)

$c_{Mg^{2+}}$ [mM]	Anteil gebundenes P_{FR} im 20 KP	Gesamtphytochrom (20 KS + 20 KP)*
0,1	5,5%	100 %
2	9,1%	90,2%
10	7,5%	88,7%
20	8,6%	83,4%
50	6,9%	81,1%

* Gesamtmenge Phytochrom bei der jeweiligen Mg^{2+} -Konzentration bezogen auf gesamtes bei 0,1 mM Mg^{2+} -Gehalt extrahiertes Phytochrom

Auch nach Vorzentrifugation bei nur 500 g lassen sich demnach nur etwa 5,5-9% Phytochrom sedimentieren. Der Anteil an gebundenem Phytochrom ist also nicht höher als bei den vorher beschriebenen Versuchen (Tab. 13).

Auffallend ist bei diesen Versuchen, daß die Gesamtmenge an Phytochrom (20 KS + 20 KP) mit steigendem Mg^{2+} -Gehalt abnimmt.

Bei weiteren Versuchen wurde nachgeprüft, ob sich der Anteil an gebundenem Phytochrom erhöhen läßt, wenn die Induktion der Bindung schon im Homogenat erfolgt. Dazu wurde die Extraktion mit einem Puffer (wie in Abb. 24 angegeben, jedoch:) mit einem Gehalt von 10 mM Mg^{2+} -Ionen durchgeführt, die übrigen, zur Phytochrombindung (bei Kürbis) nötigen Faktoren wurden an wechselnden Stellen angewendet (Tab. 15):

Tab. 15: Versuche zur in-vitro-Bindung von Phytochrom im Homogenat.

Extraktion mit MOPS-Puffer (10 mM Mg^{2+}), Zentrifugationen bei 500 g (0,5 KS und 0,5 KP) und 20.000 g (20 KS und 20 KP), vgl. Abb. 24.

HR-Belichtung 5 min im:	pH-Einstellung pH 6,5 im:	$\Delta(\Delta E)$ im 20 KS	relativer P-Gehalt im 20 KS
--	--	0,0113	100 %
--	0,5 KS	0,0108	95,6 %
Homogenat	0,5 KS	0,0102	90,3 %
0,5 KS	0,5 KS	0,0103	91,2 %

Bei Kontrollversuchen wurden außer der Rotlichtbehandlung alle übrigen zur Phytochrombindung nötigen Bedingungen angewendet (Tab. 16):

Tab. 16: Dunkelkontrollen; Extraktionen ohne Rotlichtbehandlung; Extraktionspuffer: siehe Abb. 24 ($0,1 \text{ mM MgCl}_2$).

	relativer P-Gehalt im 20 KS
a) Homogenat → 20 KS + 20 KP	100 %
b) Homogenat → 20 KS + 20 KP $\uparrow$ 10 mM Mg^{2+} $\uparrow$ pH 6,5	93,4 %
c) Homogenat → 0,5 KS → 20 KS + 20 KP $\uparrow$ 50 mM Mg^{2+} $\uparrow$ pH 6,8	91,5 %

* Zentrifugationen: a) und b): 30 min 20.000 g; c): 10 min 500 g, dann 30 min 20.000 g; Zusatz von Mg^{2+} und pH-Wert-Einstellung wie angegeben.

Zur Vereinfachung wurde bei den in Tab. 15 und 16 aufgeführten Versuchen nur die Phytochrom-Konzentration im Überstand der Zentrifugation bei 20.000 g (20 KS) gemessen. Dieser Wert reicht zur Interpretation vollständig aus:

Es zeigt sich, daß auch bei Extrakten, die nicht mit Rotlicht bestrahlt wurden, allein durch Mg^{2+} -Zugabe und pH-Erniedrigung eine leichte Abnahme des Phytochrom-Gehalts im 20 KS eintritt (Tab. 16). Durch zusätzliche HR-Bestrahlung des Homogenats oder

von 0,5 KS fällt der Anteil an löslichem Phytochrom im 20 KS nicht wesentlich unter diese Werte ab (Tab. 15).

5.2.3. Mais

Zur Kontrolle, ob sich die Ergebnisse beim Hafer als einzigartig erweisen oder ob sie auch bei anderen Pflanzen zutreffen, wurden Kontrollversuche mit Mais (*Zea mays* L.) durchgeführt.

Die Extraktion wurde wie beim Kürbis beschrieben durchgeführt (Abb. 24), jedoch wurde mit einem Verhältnis Puffer : Keimlinge = 4 : 1 extrahiert. Es wurden die Koeptilen von 6 Tage alten Maiskeimlingen verwendet, die Versuche zur Induktion der Phytochrom-Bindung erfolgten entweder nach Zentrifugation bei 500 oder 20.000 g. Die Durchführung der Versuche und ihre Ergebnisse sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17: Versuche zur in-vitro-Partikelbindung von Phytochrom in Maisextrakten

1	2a	2	2b	3			
Homogenat ↓ 0,5 KS ↓ 20 KS ↓ → 5 min HR → pH 6,8 → 10 mM Mg²⁺ ↓ 20 KS' 20 KP'	Homogenat ↓ 0,5 KS ↓ 20 KS 20 KP ↓ → pH 6,8 ↓ → 3 min HR → 10 mM Mg²⁺ ↓ 20 KS' 20 KP'	Homogenat ↓ 0,5 KS ↓ 20 KS 20 KP ↓ → 10 mM Mg²⁺ ↓ 20 KS' 20 KP' ↓ → pH 6,8 ↓ → 3 min HR ↓ 20 KS'' 20 KP''	Homogenat ↓ 0,5 KS ↓ → pH 6,8 → 3 min HR → 10 mM Mg²⁺ ↓ 20 KS 20 KP				
Phytochromgehalt in den einzelnen Fraktionen der letzten Reihe:							
95%	5%	81%	19%	83%	17%	85%	15%

Tab. 17 zeigt, daß sich auch beim Mais nur ein sehr kleiner Teil Phytochrom abzentrifugieren läßt, wenn man die bei Kürbis zu hohen Ausbeuten an gebundenem Phytochrom führenden Bedingungen anwendet. Bei Induktion der Bindung nach Abzentrifugieren bei 20.000 g erhält man einen Anteil an sedimentierbarem Phytochrom von etwa 5% (Versuch 1), bei Induktion nach 500 g immerhin von etwa 15% (Versuch 3). Wie die beiden Rekombinationsversuche 2a und 2b zeigen,

bei denen der Überstand 20 KS und der Niederschlag 20 KP unter verschiedenen Bedingungen wieder miteinander vereinigt und erneut abzentrifugiert wurden, wird bei der Zentrifugation bei 20.000 g offensichtlich ein Teil Phytochrom-bindender Strukturen abzentrifugiert, so daß man bei Induktion auf dieser Stufe nur etwa 5% gebundenes Phytochrom erhält. Gibt man diese Strukturen wieder zum 20 KS, so erhält man rund 15-20% gebundenes Phytochrom.

5.3. in-vivo-Partikelbindung von Phytochrom

5.3.1. Kürbis

Die in-vivo-Bindung des Phytochroms an Zellbestandteile und anschließende Isolierung des Phytochroms wurde von MARME et al. (6,70) beim Kürbis (Zucchini) schon mit Erfolg durchgeführt und zur Isolierung und Reinigung der Phytochrom-bindenden Strukturen benutzt. Bei einer optimalen Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM im Extraktionspuffer wurden bis zu 40% gebundenes und bei 17.000 g sedimentierbares Phytochrom erhalten. Bei Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration über 10 mM hinaus verringerte sich der Anteil an gebundenem Phytochrom wieder bis zum ohne Mg^{2+} erhaltenen Wert (= 20%, Lit. 70).

Das im Sediment (17 KP) erhaltene Phytochrom ließ sich fast vollständig in einem Puffer mit 0,1 mM Mg^{2+} -Konzentration lösen und durch erneutes Zentrifugieren von einem Großteil von Fremdstoffen (u.a. Mitochondrien) abtrennen.

Durch Zusatz von 10 mM Mg^{2+} zum Überstand dieser Zentrifugation ließ sich das Phytochrom erneut bei 100.000 g abzentrifugieren. Dies zeigt, daß der Effekt des Magnesiums auf die Bindung des Phytochroms beim Kürbis voll reversibel ist.

5.3.2. Versuche mit Hafer

5.3.2.1. Verfahren

Die Versuche zur Extraktion von partikelgebundenem Phytochrom aus Hafer wurden zunächst ähnlich dem von MARME et al. (6,70) vorgeschlagenen Verfahren durchgeführt, jedoch mit folgenden Veränderungen:

- 1) Im Hinblick auf eine Extraktion von großen Mengen an Keimlingen wurden die Keimlinge einschließlich der Primärblätter verwendet.
- 2) Der Puffer wurde im Verhältnis 1:1 (Volumen : Keimlingsgewicht, statt 4:1 beim Kürbis) zugesetzt, um höhere, besser meßbare Phytochrom-Gehalte in den Lösungen zu bekommen.
- 3) Der pH-Wert des Extraktionspuffers (pH 8,0) wurde höher als beim

Kürbis angegeben gewählt, um im Homogenat stets pH-Werte $>7,0$ zu erhalten.

4) Um bei der Aufarbeitung großer Mengen Zeit zu sparen, wurden die Keimlinge 30 sec lang in einem Mixer (statt mit Rasierklinge und Mörser) homogenisiert.

5) Da ein resuspendierter Niederschlag wegen seiner hohen Extinktion und starken Streuung mit dem Spektralphotometer Zeiss DMR 22 nicht genügend genau vermessen werden konnte, wurden solche Sedimente nach Resuspendieren und DR-Bestrahlung erneut zentrifugiert. Häufig reichen jedoch schon die Werte, die bei der Messung des Phytochromgehaltes im Überstand einer Zentrifugation erhalten werden, zu einer Interpretation der Versuche aus.

6) Statt 2-Mercaptoäthanol wurde Natriumsulfit als Reduktionsmittel eingesetzt, das in Vorversuchen keine unterschiedlichen Ergebnisse lieferte.

Die Isolierung von partikelgebundenem Phytochrom aus Haferkeimlingen wurde also nach folgendem Schema (Abb. 25) durchgeführt:

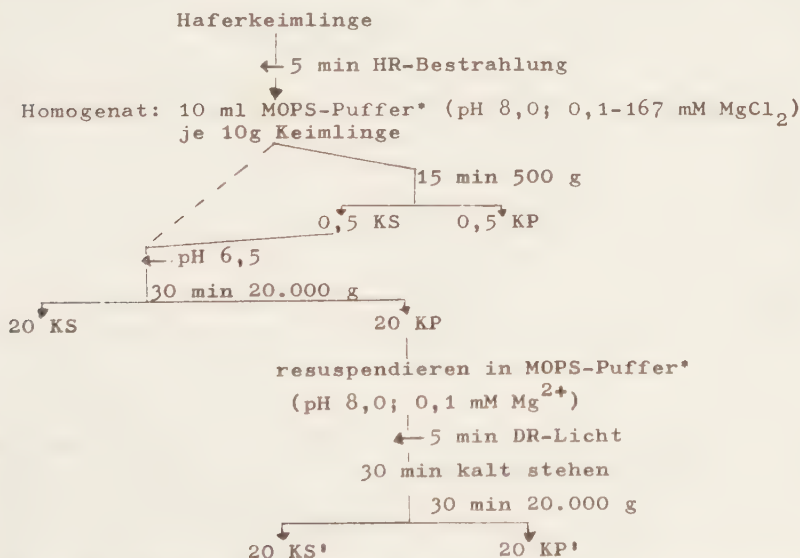


Abb. 25: Isolierung von partikelgebundenem Phytochrom aus Haferkeimlingen

*MOPS-Puffer: 25 mM MOPS, 3 mM EDTA, 3% Saccharose, 10 mM Na₂SO₃

- - -: Versuche ohne Vorzentrifugation bei 500 g

5.3.2.2. Mg^{2+} -Abhängigkeit der P_{FR} -Bindung: Versuche mit Vor-zentrifugation bei 500 g

a) Phytochromgehalt im 20 KS

Der nach der Zentrifugation bei 20.000 g erhaltene Überstand 20 KS ist die erste nach der Extraktion erhaltene Lösung, die sich wegen ihrer optischen Eigenschaften (keine Lichtstreuung, keine Trübung) gut zu einer Bestimmung ihres Phytochromgehaltes eignet. Abb. 26 (x) zeigt, daß die Menge an löslichem Phytochrom im Überstand der Zentrifugation bei 20.000 g mit steigender Magnesiumkonzentration im Extraktionspuffer stark abfällt. Bezogen auf den Phytochromgehalt, der nach Extraktion bei 0,1 mM Mg^{2+} im 20 KS gefunden wird [$\Delta(\Delta E) \approx 0,0070$], fällt die Menge an löslichem Phytochrom bei einem Mg^{2+} -Gehalt von 50-70 mM auf etwa 40% ab. Bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen scheint wieder eine leichte Zunahme des Anteils an löslichem Phytochrom einzutreten. Der Effekt ist jedoch relativ schwach, und selbst bei einer Mg^{2+} -Konzentration von ≈ 170 mM ist der Phytochromgehalt im 20 KS kleiner als 50% der bei 0,1 mM Mg^{2+} erhaltenen Menge.

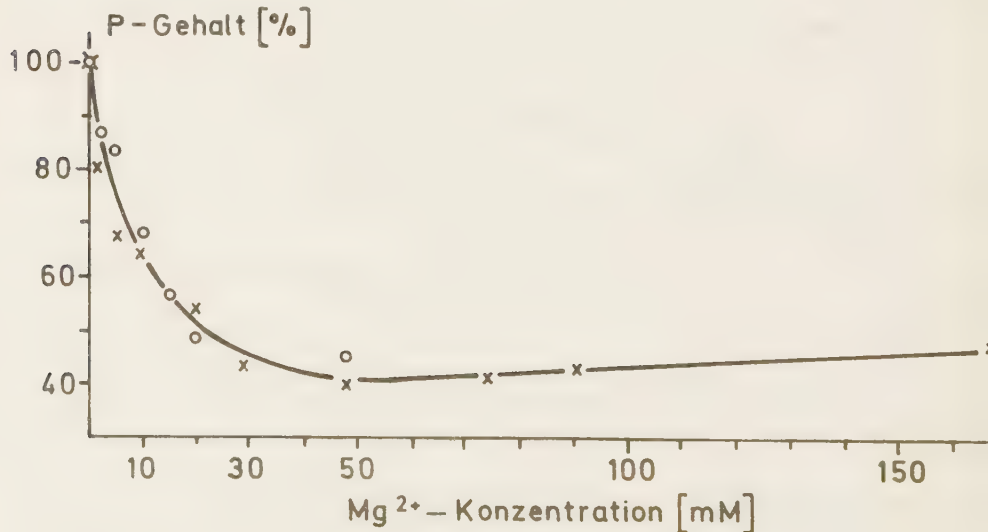


Abb. 26: Relativer Phytochromgehalt im 20 KS (x) und im 40 KS (o) in % der bei 0,1 mM Mg^{2+} erhaltenen Menge (P-Einheiten) in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration im Extraktionspuffer; Extraktion: siehe Abb. 25, 40 KS wird durch Zentrifugation des 0,5 KS bei 40.000 g statt 20.000 g erhalten.

b) Phytochromgehalt im 40 KS

Um sicherzustellen, daß der Verlauf der nach Zentrifugation bei 20.000 g erhaltenen Kurve tatsächlich auf der Wirkung der Mg^{2+} -Ionen beruht und nicht von der gewählten g-Zahl bei der Zentrifugation abhängt, wurden einige Meßreihen durchgeführt, bei denen der Überstand 0,5 KS nach pH-Einstellung nicht mit 20.000 g, sondern mit 40.000 g abzentrifugiert wurde (Abb. 26, o).

Auch hierbei war eine deutliche Abhängigkeit des Phytochromgehaltes im Überstand 40 KS von der Mg^{2+} -Konzentration im Extraktionspuffer festzustellen. Der Verlauf der Kurve (Meßpunkte: o) stimmt mit der für 20 KS (Meßpunkte: x) weitgehend überein, Abweichungen liegen innerhalb der Meßgenauigkeit der Methode.

Die absoluten Mengen an löslichem Phytochrom nehmen zwar, wie Tab. 18 zeigt, durch erneute Zentrifugation bei 40.000 g einer bei 20.000 g vorzentrifugierten Probe noch weiter ab, die Abnahme (in %) ist jedoch (wie Abb. 26 beweist) unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration.

$c_{Mg^{2+}}$ mM	(E) $\times 10^4$	
	20 KS	40 KS
0,1	78	64
4,8	62	55
9,9	58	53
19,6	47	38

Tab. 18:

Phytochromgehalt im Überstand nach Zentrifugation bei 20.000 g (20 KS) und 40.000 g (40 KS).

Extraktion nach Abb. 25, 20 KS wird erneut 30 min bei 40.000 g zentrifugiert.

Damit ist nachgewiesen, daß tatsächlich ein von der Mg^{2+} -Konzentration abhängiger Effekt gemessen wurde.

c) Phytochromgehalt im 0,5 KS

Zur Kontrolle, ob auch vor Zentrifugation bei 20.000 g schon eine Magnesiumabhängigkeit des Phytochromgehalts festzustellen war, wurde der nach Zentrifugation bei 500 g erhaltene Überstand ausgemessen. Die dabei erhaltenen Meßwerte waren zwar wegen der starken Trübung der Lösung nur ungenau, jedoch ließ sich auch hier mit steigender Mg^{2+} -Konzentration schon eine Abnahme des Phytochromgehalts feststellen. Bei einem Mg^{2+} -Gehalt von ~ 100 mM im Extraktionspuffer war der Phytochromgehalt im 0,5 KS etwa 20-30% geringer als bei ~ 20 mM Mg^{2+} .

d) Phytochromgehalt in den Sedimenten 20 KP und 0,5 KP

Zur Bestimmung des Phytochromgehaltes wurde der Niederschlag der Zentrifugation bei 20.000 g in Puffer resuspendiert, erneut bei 20.000 g abzentrifugiert (vgl. Abb. 25) und der nun erhaltene Überstand 20 KS' gemessen. Um sicherzugehen, daß sich möglichst alles im 20 KP vorhandene Phytochrom löst, wurde das Sediment in einem relativ großen Volumen Puffer (1/2 Vol. bezogen auf das Volumen von 0,5 KS) resuspendiert und nach DR-Belichtung ($P_{FR} \rightarrow P_R$) noch 30 min stehen gelassen, um eine vollständige Ablösung des Phytochroms von den bindenden Strukturen zu erreichen.

Wie nach den Messungen des Phytochromgehalts im 20 KS (lösliches Phytochrom, vgl. Abb. 26) zu erwarten war, steigt die Phytochrommenge im 20 KS', d.h. auch im 20 KP, mit steigender Mg^{2+} -Konzentration zunächst an, es wird also mehr Phytochrom gebunden und abzentrifugiert. Schon bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM wird aber ein Maximum an gebundenem Phytochrom erreicht und bei höheren Konzentrationen an Mg^{2+} fallen die Werte rasch wieder ab (Abb. 27).

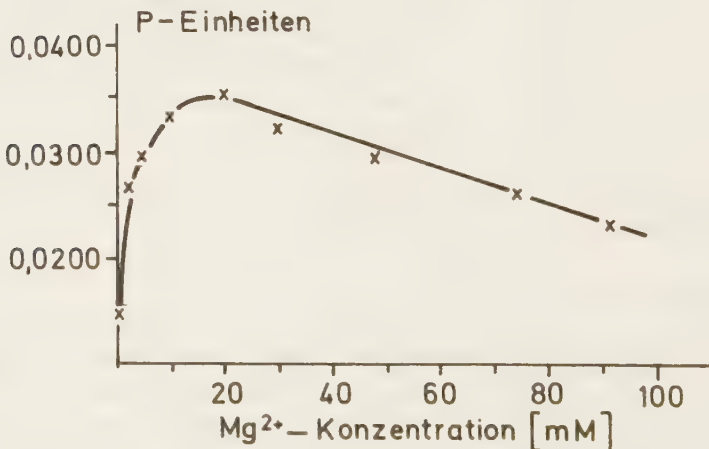


Abb. 27: P-Einheiten im 20 KP (gemessen als 20 KS') in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration im Extraktionspuffer.

Extraktion nach Abb. 25 mit Vorzentrifugation bei 500 g (Volumen des 20 KP: 4,5 - 5 ml)

Vergleicht man die Kurven für die Menge an löslichem (Abb. 26) und gebundenem Phytochrom (Abb. 27), so zeigt sich nicht der erwartete, annähernd spiegelbildliche Verlauf. Oberhalb einer Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM fällt die Menge an gebundenem Phytochrom nämlich relativ rasch wieder ab, obwohl auch die Menge an löslichem Phytochrom weiter abnimmt. Oberhalb von 50 mM Mg^{2+} steigt die Kurve für das lösliche Phytochrom erheblich geringer an als die für das gebundene abfällt.

Die Addition der bei den einzelnen Versuchen erhaltenen Mengen an löslichem und gebundenem Phytochrom ergab, daß die Gesamtmenge (P_{Tot} = Summe der P-Einheiten im 20 KS und 20 KS') nicht konstant war (siehe Abb. 29a, Kurve A). Vielmehr fällt die Phytochrommenge mit steigendem Mg^{2+} -Gehalt im Extraktionspuffer zunächst rasch ab, bis bei etwa 50 mM nur mehr 65% des ohne Mg^{2+} erhaltenen Phytochroms vorhanden ist. Bei noch höheren Magnesiumkonzentrationen verläuft die Kurve dann wieder flacher. Für den unerwarteten Verlauf der Kurven (in Abb. 26, 27 und 29a, Kurve A) gab es 2 Erklärungsmöglichkeiten, nämlich:

1. das gebundene Phytochrom (20 KP) geht beim Resuspendieren in Puffer nicht vollständig in Lösung bzw. wird beim erneuten Zentrifugieren mit Fremdprotein mitgerissen und erneut sedimentiert;
2. bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen wird ein Teil des gebundenen Phytochroms schon bei 500 g abzentrifugiert oder gar nicht erst in Lösung (d.h. ins Homogenat) gebracht.

Ein Einfluß von Mg^{2+} -Ionen auf die Photoreversibilität von Phytochrom und damit auf die bei den Messungen gefundene Phytochrommenge besteht im untersuchten Bereich (bis 250 mM Mg^{2+}) nicht.

Zur Klärung der Frage, welche der eben erwähnten Möglichkeiten zutraf, wurde der nach Resuspendieren und Abzentrifugieren von 20 KP erhaltene Niederschlag erneut resuspendiert und auf Phytochrom untersucht. Dabei konnte zwar in allen Fällen noch eine geringe Menge an Phytochrom gelöst werden, die Menge war jedoch bei hohen Mg^{2+} -Konzentrationen ebenso hoch wie bei niedrigen und stets sehr gering (10%) im Verhältnis zum beim erstenmal schon gelösten Phytochrom. Außerdem brachten Meßreihen, bei denen dem Resuspensionspuffer unterschiedliche Mengen an EDTA zur Komplexbildung von Mg^{2+} zugesetzt wurden, in keinem Fall einen deutlich erhöhten Anteil an Phytochrom im 20 KS' gegenüber Lösungen ohne EDTA.

Deshalb konnten Verluste durch nicht vollständiges Auflösen des 20 KP nicht für die Abnahme der Gesamtmenge an Phytochrom verantwortlich sein. Hinweise darauf, daß die Ursache für die geringe Ausbeute an Phytochrom schon auf frühen Stufen der Aufarbeitung lag, lieferten die allerdings sehr ungenauen Werte für den Phytochromgehalt im Überstand der Zentrifugation bei 500 g (0,5 KS, vgl. S. 87). Die Beobachtung, daß auch hier schon eine Abnahme im Phytochromgehalt vorhanden ist, gab Anlaß, das Sediment dieser Zentrifugation (0,5 KP) zu untersuchen (Tab. 19).

Tab. 19: Phytochromgehalt im 0,5 KP

Extraktion nach Abb. 25, resuspendieren des Sediments
0,5 KP in 5 ml Puffer, abzentrifugieren bei 20.000 g,
Phytochrombestimmung im Überstand.

$c_{Mg^{2+}} [mM]$	0,1	5	10	20	48	91	
$\Delta(\Delta E)$ im 0,5 KP	9	17	18	26	32	33	$\times 10^{-4}$
$\Delta(\Delta E)$ im 20 KS	69	58	57	38	37	37	$\times 10^{-4}$
$\Delta(\Delta E)$ im 20 KS'	24	34	47	52	47	44	$\times 10^{-4}$
P_{Tot}^*	0,113	0,100	0,111	0,089	0,090	0,087	
% P im 0,5 KP	3,8	8,2	7,7	14,1	17,1	18,3	

* Summe der P-Einheiten im 0,5 KP, 20 KS und 20 KS'

Man findet also nach Zentrifugation bei 500 g mit steigender Mg^{2+} -Konzentration auch eine steigende Menge an Phytochrom im Niederschlag 0,5 KP, die bei 50 mM Mg^{2+} etwa 17% des gesamten extrahierten Phytochroms beträgt. Zwar fällt auch jetzt die Gesamtmenge an Phytochrom noch ab, jedoch nur mehr auf 75% des Wertes bei 0,1 mM Mg^{2+} . Dies bestätigt die Vermutung, daß ein Teil des gebundenen Phytochroms bei Extraktion mit hohen Mg^{2+} -Konzentrationen schon bei 500 g sedimentiert und ein anderer Teil nicht im Homogenat erscheint, sondern im Preßrückstand, also an unlösliche Zellfragmente gebunden, zurückbleibt.

5.3.2.3. Versuche zur Verhinderung einer Partikelbindung von Phytochrom durch Erhöhung der Ionenstärke

Durch Zugabe von Natriumchlorid zum Extraktionspuffer wurde versucht, eine Bindung des Phytochroms an Zellpartikel zu verhindern. Es zeigte sich jedoch, daß sich die Menge an Phyto-

chrom im Überstand einer Zentrifugation bei 40.000 g vom NaCl-Gehalt unbeeinflusst blieb (Tab. 20).

Auch wenn das Natriumchlorid erst zu einem vorgereinigten Extrakt (0,5 KS) gegeben wurde, ließ sich der Anteil an löslichem Phytochrom selbst durch eine Konzentration von 180 mM nicht erhöhen (Tab. 20).

Die durch Mg^{2+} -Ionen bewirkte Bindung und Sedimentierbarkeit von P_{FR} läßt sich also durch eine hohe Ionenstärke nicht wieder rückgängig machen.

Tab.20: Einfluß von NaCl auf die Menge an löslichem Phytochrom im 40 KS

Extraktion nach Abb. 25, jedoch Zugabe von NaCl zum Extraktionspuffer oder zum 0,5 KS und Zentrifugation bei 40.000 g

Gehalt [mM] der Lösung an Mg^{2+}		$\Delta(\Delta E)$ im 40 KS; NaCl-Zugabe zum	
	NaCl	Extraktionspuffer	0,5 KS
~ 20	0	60×10^{-4}	58×10^{-4}
"	95	61 "	58 "
"	180	54 "	59 "
~ 90	0	45 "	49 "
"	95	53 "	51 "
"	180	46 "	54 "

5.3.2.4. Versuche ohne Vorzentrifugation bei 500 g

Um zu verhindern, daß ein großer Teil an gebundenem Phytochrom schon durch Vorzentrifugation bei 500 g verloren ging, wurden die in Kap. 5.3.2.2. beschriebenen Versuche teilweise ohne diese Zentrifugation wiederholt. Dabei ergab sich für die Menge an löslichem Phytochrom (im 20 KS) eine ähnliche Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration (Abb. 28, Kurve A) wie bei den Versuchen mit Vorzentrifugation. Bei der Menge an gebundenem Phytochrom wurde jedoch ein wesentlich anderes Verhalten festgestellt (Abb. 28, Kurve B). Das Maximum an gebundenem Phytochrom erhält man auch hier bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM, bei höheren Konzentrationen fallen die Werte jedoch nur mehr wenig ab, was in erster Linie daher kommt, daß das sonst

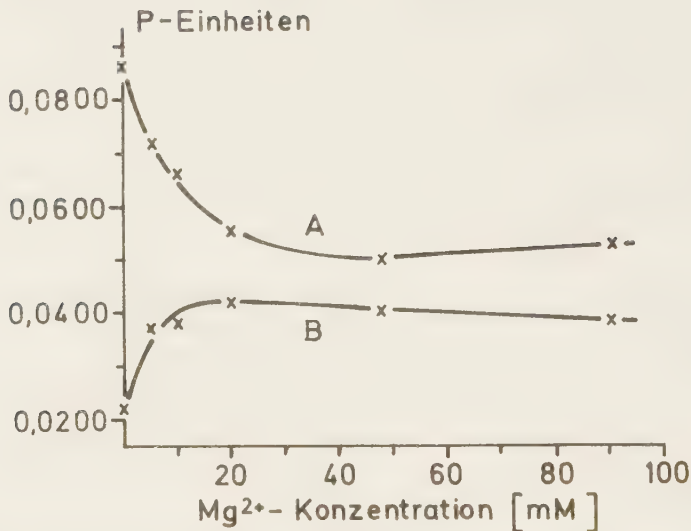


Abb. 28: P-Einheiten im 20 KS (Kurve A) und im 20 KP (gemessen als 20 KS', Kurve B) in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration im Extraktionspuffer
Extraktion nach Abb. 25 ohne Vorzentrifugation bei 500 g (Volumen des 20 KS: ~15 ml, 20 KS': ~5 ml)

im 0,5 KP sedimentierte Phytochrom hier dem Anteil an gebundenem Phytochrom zugerechnet wird.

Dementsprechend nimmt auch die Gesamtmenge an extrahiertem Phytochrom nur mehr auf ~85% des bei 0,1 mM Mg^{2+} erhaltenen Wertes (gegenüber ~60% bei den Versuchen mit Vorzentrifugation) ab (Abb. 29b, Kurve A). Die Restmenge an Phytochrom dürfte im Preßrückstand der Extraktion zurückbleiben. Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse einer Meßreihe, bei der ein Preßrückstand nach Extraktion mit einer Mg^{2+} -Konzentration von 48 mM erneut in Puffer resuspendiert und wie gewohnt aufgearbeitet wurde. Es wurden rund 9% des gesamten Phytochroms dabei extrahiert.

5.3.2.5. Dunkelkontrollen: Mg^{2+} -Abhängigkeit der P_R -Bindung

Zur Kontrolle der Spezifität der P_{FR} -Bindung in den vorher beschriebenen Versuchen wurden einige Meßreihen mit dunkel gehaltenen Keimlingen durchgeführt (Extraktion nach Abb. 25, ohne Zentrifugation bei 500 g). Dabei wurde festgestellt, daß im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 91 mM Mg^{2+} nur 7-10% (bezogen auf die bei 0,1 mM Mg^{2+} erhaltene Gesamtmenge) Phytochrom als P_R sedimentiert wird (Abb. 29c, Kurve C). Das restliche Phytochrom bleibt im Überstand der Zentrifugation bei 20.000 g. Auch bei den Dunkelkontrollen trat mit steigender Mg^{2+} -Konzentration eine Abnahme des gesamten extrahierten Phytochroms um ~15% ein (Abb. 29c, Kurve A).

5.3.2.6. Vergleich der Versuche mit und ohne Vorzentrifugation und der Dunkelkontrollen

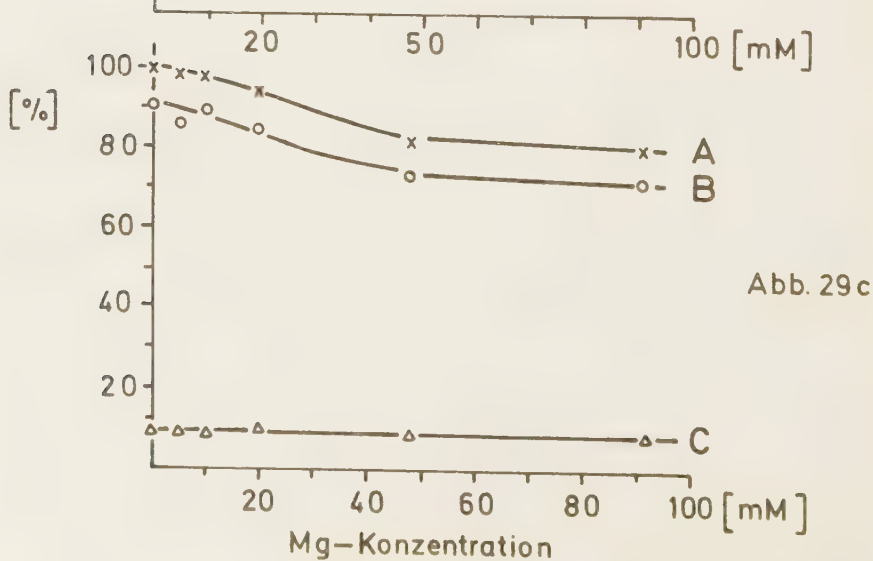
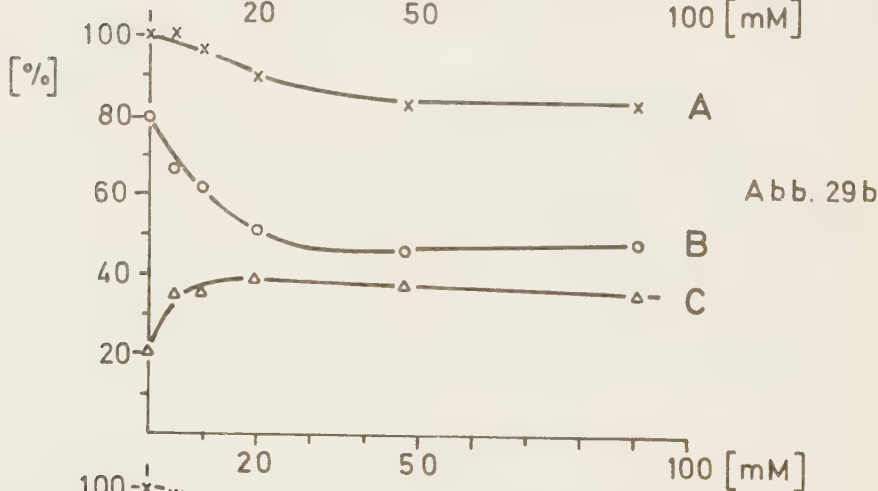
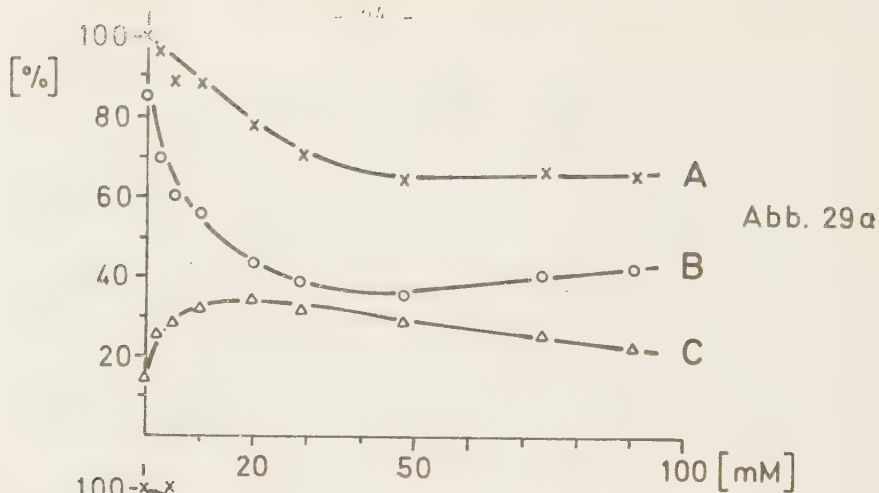
Die beschriebenen Versuchsergebnisse zeigen, daß sich Phytochrom aus mit Rotlicht bestrahlten Keimlingen in Gegenwart von Magnesium leicht sedimentieren läßt.

Bezieht man die Mengen an löslichem bzw. gebundenem Phytochrom, die man bei Extraktion mit Mg^{2+} in den einzelnen Fraktionen findet, auf die Gesamtmenge an Phytochrom, die ohne Mg^{2+} extrahiert wird, so erhält man die in den Abb. 29a-c dargestellten Kurven.

Man erkennt, daß die Gesamtmenge an extrahiertem Phytochrom (Kurven A) in jedem Fall mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration abnimmt. Bei Vorzentrifugation der Homogenate bei 500 g nimmt die nach Zentrifugation bei 20.000 g noch vorhandene Phytochrommenge aber viel stärker ab (Abb. 29a) als ohne Vorzentrifugation (Dunkelkontrollen und Extrakte aus HR-belichteten Keimlingen sind in diesem Punkt gleich, Abb. 29b und 29c).

Dies macht sich auch bei den Kurven für das lösliche (Kurven B) und das gebundene (Kurven C) Phytochrom bemerkbar: Beide Kurven der Abb. 29a liegen unter den entsprechenden Werten der Abb. 29b.

Ohne Vorzentrifugation nimmt die Menge an löslichem Phytochrom bei 20 mM Mg^{2+} auf etwa 60% des in Dunkelkontrollen gefundenen Wertes ab, mit Vorzentrifugation aber auf etwa 50%. Dementsprechend steigt die Menge an gebundenem Phytochrom ohne Vorzentrifugation von ~20% in Mg^{2+} -freien Extrakten auf ~40% bei Gegen-



wart von 20 mM Mg^{2+} an, mit Vorzentrifugation dagegen auf 35% an (Dunkelkontrollen: konstant bei 8-10%). Oberhalb 20 mM Mg^{2+} -Gehalt tritt nur bei Versuchen mit Vorzentrifugation wieder eine ausgeprägte Abnahme des Anteils an gebundenem Phytochrom ein, die darauf beruht, daß ein großer Teil an gebundenem Phytochrom (bei 50 mM Mg^{2+} bis zu 25% des gesamten, vgl. Tab. 19) schon bei 500 g abzentrifugiert wird.

5.4. Anwendung der P_{FR} -Partikelbindung zur Isolierung und Reinigung von Phytochrom

5.4.1. Puffermenge zum Resuspendieren des gebundenen Phytochroms

Aus Abb. 29 geht hervor, daß die größte Menge an Phytochrom bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM im Extraktionspuffer an eine partikuläre Zellfraktion gebunden wird.

Da bei der Isolierung und Reinigung von Phytochrom aus größeren Mengen an Keimlingen mit einem möglichst geringen Volumen gearbeitet werden sollte, wurde in weiteren Meßreihen untersucht, welches das optimale Volumen zum Resuspendieren der Sedimente nach Zentrifugation bei 20.000 g ist.

Abb. 29: in-vivo-Partikelbindung von Phytochrom aus Hafer in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration im Extraktionspuffer

a: HR-belichtete Keimlinge, Extraktion mit Vorzentrifugation bei 500 g;

b: HR-belichtete Keimlinge, Extraktion ohne Vorzentrifugation bei 500 g;

c: Dunkelkontrollen, Extraktion ohne Vorzentrifugation.

A: gesamtes extrahiertes Phytochrom = 20 KS + 20 KP,

B: lösliches Phytochrom = 20 KS,

C: gebundenes Phytochrom = 20 KP, gemessen als 20 KS'.

Aufgetragen sind die bei den jeweiligen Mg^{2+} -Konzentrationen gemessenen P-Einheiten in % der bei 0 bzw. 0,1 mM Mg^{2+} extrahierten P-Einheiten.

Die Aufarbeitung wurde analog der in Abb. 25 gegebenen Vorschrift durchgeführt, jedoch wurden mehrere Parallelproben in gleicher Weise bis zum 20 KP verarbeitet, dann in unterschiedlichen Mengen Puffer resuspendiert und wie beschrieben weiterbehandelt. Wie erwartet stieg die absolute Konzentration an Phytochrom (Abb. 30, Kurve A) in den aufgelösten Sedimenten mit fallender Menge an Resuspensionspuffer stark an, die Werte für die Gesamtmenge (P-Einheiten) an wiederaufgelöstem Phytochrom nahmen jedoch stark ab (Abb. 30, Kurve B).

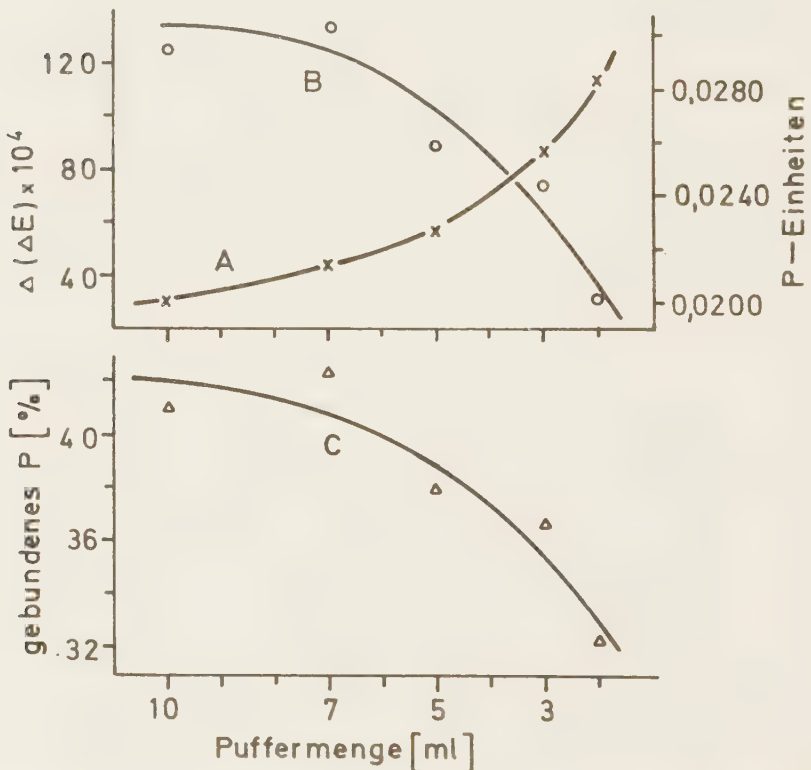


Abb. 30: oben: Phytochrom-Konzentration (Kurve A) und Phytochrommenge (P-Einheiten, Kurve B);
unten: Anteil gebundenes Phytochrom (Kurve C) im 20 KS' in Abhängigkeit von der Menge Puffer, in der 20 KP resuspendiert wird;
Extraktion: vgl. Abb. 25

Beim Resuspendieren eines Sediments aus 10 ml Homogenat in 7-10 ml Puffer erhält man die höchsten Ausbeuten an gebundenem Phytochrom, bei Resuspendieren in weniger als 5 ml fällt die Ausbeute rasch ab (von ~40% gebundenem P_{FR} auf etwa 30%; Abb. 30, Kurve C).

Nach diesen Ergebnissen muß man also abwägen, ob man eine möglichst hohe Ausbeute an Phytochrom (großes Volumen Puffer) haben möchte oder zugunsten eines geringeren Volumens bei der weiteren Reinigung des Phytochroms mit geringeren Ausbeuten zufrieden ist.

5.4.2. Reinigung durch wiederholte Partikelbindung des Phytochroms

Versuche, partikelgebundenes Phytochrom nach Lösung von seinen Rezeptoren durch erneute Bestrahlung mit HR-Licht, Mg^{2+} -Zugabe und pH-Erniedrigung zu sedimentieren, schlugen fehl, da nur mehr etwa 20% Phytochrom im Niederschlag gefunden wurden. Die zur P-Bindung nötigen Rezeptoren gingen während der Aufarbeitung offensichtlich verloren.

5.4.3. Hydroxylapatit-Adsorption und Desorption

Nach Auflösen von partikelgebundenem Phytochrom (20 KS') wurde versucht, diese Lösung durch Adsorption an Hydroxylapatit bei pH 6,2 und anschließende Desorption mit Kaliumphosphatpuffer (0,3 M; pH 7,8) zu reinigen (vgl. Tab. 7, S. 34).

Dieses Ziel wurde zwar erreicht, indem Phytochromlösungen mit relativ hohen spezifischen Aktivitäten (Tab. 21) erhalten wurden. Die Ausbeute betrug aber nur 40-50%, so daß die Methode im Anschluß an die Partikelbindung des Phytochroms (Ausbeute ebenfalls nur rund 50%) zu verlustreich ist.

5.4.4. Ammoniumsulfatfällung

Die Ausfällung von Proteinen aus ihren Lösungen geschieht sowohl zur Konzentrierung als auch zur Reinigung der Proteine. Auch bei der Ammoniumsulfatfällung von wiederaufgelöstem, vorher partikelgebundenem Phytochrom (20 KS') wurden diese Ziele erreicht, jedoch unter Verlust von wiederum mindestens 50% an Phytochrom. Damit liegt die Ausbeute bei diesem Schritt weit unter den üblicherweise bei einer Ammoniumsulfatfällung erreich-

ten Werten. Deshalb ist auch diese Methode zur Weiterreinigung von Phytochromlösungen nach Partikelbindung nicht gut geeignet.

Tab. 21: Reinigung von partikelgebundenem Phytochrom an Hydroxylapatit; Methode: Extraktion nach Abb. 25, Mg^{2+} -Gehalt im Extrakt: 20 mM ($\sqrt{20}$ KS + 20 KS'); Adsorption von 20 KS' an 8 g Hydroxylapatit je 100 ml Lösung, pH 6,2; Desorption mit 1/5 Vol. 0,3 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8 (vgl. Tab. 7).

	$\Delta(\Delta E)$	Ausbeute*	Proteinkonz. [mg/ml]	Spez. Aktivität
20 KS	0,0035	54%	14,6	$2,4 \times 10^{-4}$
20 KS'	0,0090	46%	7,0	$12,8 \times 10^{-4}$
AÜ 2	0,0166	20%	2,19	$75,8 \times 10^{-4}$

* bezogen auf Gesamtphytochrom (20 KS + 20 KS')

Tab. 22: Reinigung von partikelgebundenem Phytochrom durch Ammoniumsulfatfällung; Methode: Extraktion nach Abb. 25, Mg^{2+} -Gehalt im Extrakt: 20 mM ($\sqrt{20}$ KS + 20 KS'); Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung zum 20 KS' (gleiches Volumen), Resuspendieren des Niederschlags in 1/5 Volumen ($\sqrt{ASF}$ -Ü 2).

	$\Delta(\Delta E)$	Ausbeute*	Proteinkonz. [mg/ml]	Spez. Aktivität
20 KS	0,0030	46%	3,97	$7,6 \times 10^{-4}$
20 KS'	0,0070	54%	2,56	$27,3 \times 10^{-4}$
ASF-Ü 2	0,0145	29%	2,74	$52,9 \times 10^{-4}$

* bezogen auf Gesamtphytochrom (20 KS + 20 KS')

5.5. Diskussion

Das von QUAIL, MARME, SCHÄFER und anderen (6,95,96) entwickelte Modell, das die Primärwirkung von Phytochrom durch Wechselwirkungen mit spezifischen Membranen zu beschreiben versucht, basiert hauptsächlich auf Versuchen zur Partikelbindung des Phytochroms bei Kürbis. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch gezeigt, daß nur ein Teil der Ergebnisse, auf die sich dieses Modell stützt, sich in ähnlicher Weise bei anderen Pflanzen reproduzieren läßt. Bei Mais und Hafer läßt sich die für Kürbis (68,69) beschriebene Partikelbindung von Phytochrom nach Belichtung von zellfreien Extrakten nicht nachvollziehen, und man muß deshalb annehmen, daß die in-vitro-Partikelbindung bei Kürbis ein Sonderfall ist, der keine allgemeine Bedeutung zur Erklärung der Phytochromeffekte hat.

Im Extrakt etiolierter Haferkeimlinge läßt sich nämlich keine in-vitro-Partikelbindung von Phytochrom induzieren (Tab. 23 und Kap. 5.2.2.). Es lassen sich lediglich sehr geringe Mengen an Phytochrom (bis zu 10%, das ist nicht mehr als in Dunkelkontrollen) sedimentieren. Eine verstärkte Phytochrombindung wurde auch dann nicht beobachtet, wenn die Keimlinge mit 10 mM Mg^{2+} extrahiert wurden und der Überstand einer Zentrifugation bei 500 g belichtet wurde. Dieses Verfahren führt bei Maiskoleoptilen zu einer Phytochrombindung von 37% (91).

Tab. 23: in-vitro-Partikelbindung von Phytochrom (vgl. Kap. 5.2.)

	Mg^{2+} -Gehalt im Extrakt	Bestrahlung von	Mg^{2+} -Gehalt der bestrahlten Lösung	% gebun- denes P_{FR}
Kürbishaken	0,1 mM	20 KS	10 mM	70%
Hafer- keimlinge	0 mM	10 KS	0 - 90 mM	2-5%
	0,1 mM	0,5 KS	0,1-50 mM	5,5-9%
	10 mM	Homogenat	10 mM	10%
	10 mM	0,5 KS	10 mM	10%
	0,1 mM	--- (Dunkelkontrollen)	10-50 mM	6-9%
Mais- koleoptilen	0,1 mM	20 KS	10 mM	3-5%
	0,1 mM	0,5 KS	10 mM	15-19%

Bei Kürbis dagegen sedimentieren nach Rotlichtbestrahlung eines zentrifugierten Extraktes und nachträglicher Zugabe von 10-20 mM Mg^{2+} -Ionen bis zu 70% des gesamten extrahierten Phytochroms (Tab. 23, Kap. 5.2.1.).

Ähnliche Versuche mit Maiskoleoptilen geben bei Belichtung eines bei 20.000 g zentrifugierten Extraktes wie bei Hafer nur 3-5%, bei der Belichtung nach Zentrifugation bei 500 g (Extraktion ohne Mg^{2+}) aber bis zu 20% sedimentierbares (= "gebundenes") Phytochrom (Tab. 23, Kap. 5.2.3.).

Die geringe in-vitro-Sedimentation von Phytochrom aus Hafer wird sicher nicht durch Belichtung induziert. Die beobachtete Abnahme an löslichem Phytochrom (Tab. 15, vgl. auch Abb. 29c, Kurve B) dürfte durch eine vom Mg^{2+} bewirkte und durch pH-Erniedrigung verstärkte höhere Vernetzung und Aggregation von Proteinen und sonstigen Bestandteilen der Extrakte hervorgerufen werden (z.B. Aggregation von Membranvesikeln, vgl. Lit. 70, oder Ribonukleoproteiden, vgl. Lit. 93), wobei Phytochrom in geringen Mengen adsorbiert wird. Das gleiche gilt auch für Mais, wenn auch die Tatsache, daß hier je nach den Extraktionsbedingungen (vgl. Kap. 5.2.3. und Lit. 91) ein höherer Anteil an sedimentierbarem Phytochrom gefunden wird, darauf schließen läßt, daß diese erhöhte Menge an P_{FR} anders, möglicherweise spezifisch gebunden wird. Die bei Kürbis Phytochrom-bindenden Partikel scheinen demnach bei Hafer überhaupt nicht extrahierbar zu sein, oder sie sind nach der Extraktion so verändert, daß keine Bindung mehr möglich ist. Bei Mais werden sie in Abwesenheit von Mg^{2+} bei 20.000 g abzentrifugiert, und bei Kürbis bleiben sie auch nach Zentrifugation bei 20.000 g weitgehend in Lösung und befähigt, Phytochrom zu binden.

Versuche von PRATT (86), die nach Abschluß dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigen die oben aufgeführten Ergebnisse. PRATT fand bei vergleichenden Versuchen mit verschiedenen Pflanzen, daß nur bei Kürbis (*Cucurbita pepo* L.) und der Gurke (*Cucumis sativus* L.) eine in-vitro-Partikelbindung stattfindet. Weitere Hinweise dafür, daß die in-vitro-Partikelbindung bei Kürbis unspezifisch ist, wurden inzwischen von QUAIL bei Untersuchungen von phytochrombindenden Strukturen mittels Dichtegradientenzentrifugation gefunden (93,94). Er zeigte, daß Phytochrom unter den Bedingungen, bei denen es nach in-vitro-Belich-

tung sedimentiert, mit Ribosomenmaterial assoziiert ist. Die "Bindung" des Phytochroms ließ sich sowohl durch EDTA als auch durch hohe Ionenstärken (NaCl oder Mg^{2+}) wieder aufheben. Nach QUAIL liegt deshalb keine spezifische Wechselwirkung zwischen Phytochrom und einer "gelösten" Membranfraktion, sondern eine elektrostatische Adsorption von Phytochrom an Ribosomenmaterial vor, die unabhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} ist. Eine Mg^{2+} -abhängige Zunahme der " P_{FR} -Bindung" wird durch verstärkte Aggregation der mit Phytochrom assoziierten Partikel lediglich vorge-tauscht.

Bei Mais und bei Hafer ließ sich die beschriebene Assoziation zwischen Phytochrom und einem Ribonukleoprotein nicht nachweisen, und es bleibt offen, woran das bei Mais in-vitro sedimentierbare Phytochrom (91) gebunden ist.

Die hohe in-vitro-Partikelbindung bei Kürbis ist demnach ein Sonderfall, dem keine allgemeine Bedeutung zukommt.

Die in-vivo-Partikelbindung bei Hafer dagegen kann, wie in-zwischen gezeigt wurde, als repräsentativ für die meisten Pflanzen gelten. Denn sie tritt nicht nur bei Hafer (diese Arbeit, Kap. 5.3.2.), sondern auch bei Mais (68,91,95,96,125) und einer Reihe von Dikotyledonen, z.B. Sonnenblumen, Senf und Erbsen (86), auf.

Durch Bestrahlung von intakten Keimlingen wird beim Hafer eine Partikelbindung induziert, so daß schon in Mg^{2+} -freien Extrakten bis zu 20% des gesamten extrahierten Phytochroms sedimentieren (gegenüber 7-10% bei Dunkelkontrollen). Bei Zugabe von 20 mM Mg^{2+} zum Extraktionspuffer steigt der Anteil an gebundenem Phytochrom auf etwa 40% an. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Partikelbindung des Phytochroms im intakten Keimling stattfindet, daß aber nur bei Gegenwart von genügend Mg^{2+} -Ionen eine optimale Aggregation der phytochrombindenden Partikel eintritt, die die Sedimentation des gebundenen Phytochroms erlaubt. Auch in Extrakten aus dunkel gehaltenen Keimlingen kann man eine solche Aggregation von Zellpartikeln unter dem Einfluß von Mg^{2+} -Ionen beobachten, ohne daß jedoch mehr Phytochrom sedimentiert wird als ohne Mg^{2+} .

Bei Hafer tritt oberhalb der optimalen Mg^{2+} -Konzentration von 20 mM nur eine minimale Abnahme des Anteils an gebundenem Phytochrom (von ~39% bei 20 mM auf ~36% bei über 90 mM, Abb. 29b, Kurve C) ein, und auch bei drastischer Erhöhung der Ionenstärke

durch Zugabe von ~ 180 mM NaCl zum Extraktionspuffer findet man keine Zunahme an löslichem Phytochrom. Im Gegensatz dazu wird bei Kürbis (70) ein ausgeprägtes und bei Mais (68) ein weniger deutliches Maximum der Bindung bei 10-20 mM Mg^{2+} beobachtet, und bei Erhöhung der Ionenstärke durch weiteren Zusatz von Mg^{2+} oder NaCl nimmt der Anteil an gebundenem Phytochrom rasch wieder ab.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß es sich bei der im Hafer in-vivo induzierten Partikelbindung um keine mehr oder weniger unspezifische, auf Ionenkräften beruhende Assoziation handelt, wie sie für partikelgebundenes Phytochrom aus Kürbis (93,94) beschrieben wurde. Vielmehr muß die Bindung beim Hafer erheblich stabiler sein, da sie durch Erhöhung der Ionenstärke nicht wieder gelöst wird.

Diese stabile Bindung von Phytochrom an Zellpartikel und anschließende Sedimentation ist nur nach Umwandlung des Phytochroms in die P_{FR} -Form und nur in intakten Keimlingen möglich. Hellrot-Bestrahlung von Extrakten vermag keine gegenüber Dunkelkontrollen erhöhte Bindung zu induzieren. Durch Extraktion werden beim Hafer offensichtlich alle Strukturen zerstört, die zur Phytochrombindung in-vivo befähigt sind.

In Verbindung mit mehreren Arbeiten, die nach Abschluß der Versuche veröffentlicht wurden, kann man schließen, daß die in-vivo-Partikelbindung tatsächlich ein generell verbreitetes Phänomen ist, bei dem das physiologisch aktive P_{FR} mit spezifischen Bindungsstellen einer Membran oder eines anderen, nicht identifizierten Zellpartikels assoziiert wird. Diese Bindung könnte dann den ersten Vorgang der Reaktionskette darstellen, die zu der morphogenetischen Aktivität führt.

Für diese Annahme sprechen mehrere Gründe:

- 1) Die in-vivo-Partikelbindung von Phytochrom tritt (wie schon erwähnt wurde) nicht nur bei Hafer, Mais und Kürbis, sondern bei allen bisher daraufhin untersuchten Pflanzen (86) auf.
- 2) Durch Behandlung von intakten Maiskeimlingen mit Glutaraldehyd konnte YU (137,138) eine Immobilisierung von Phytochrom erzeugen. Er konnte zeigen, daß die dadurch ähnlich wie durch Mg^{2+} bewirkte Sedimentation von Phytochrom (P_{FR}) weder auf nachträglicher Reaktion von Phytochrom mit Glutaraldehyd (beim Homogenisieren der Keimlinge) beruht noch durch unspezifische Aggre-

gation von Phytochrom mit Membranen oder Proteinen bewirkt wird, sondern daß dieser Effekt eine durch Rotlicht induzierte in-situ-Assoziation von Phytochrom mit Zellpartikeln wiedergibt. Ein Vergleich von Extrakten aus Glutaraldehyd-behandelten Keimlingen (Mg^{2+} -freie Extraktion) und Mg^{2+} -haltigen Extrakten ergab eine fast vollständige Übereinstimmung im Verhalten bezüglich der Sedimentation und der Kinetiken der Dunkelreaktionen des Phytochroms in der löslichen und in der gebundenen Form.

Dies bestätigt die Annahme, daß auch die Mg^{2+} -abhängige Sedimentation von Phytochrom nach in-vivo-Phototransformation das Ergebnis eines intrazellulären Vorgangs ist, bei dem eine Assoziation von P_{FR} mit spezifischen bindenden Strukturen eintritt.

3) Durch immunchemische Markierung von Phytochrom in Haferkoleoptilen wurde nachgewiesen, daß Phytochrom in der P_R -Form im ganzen Zytoplasma gleichmäßig verteilt ist (90), während das physiologisch aktive P_{FR} in eng begrenzten Zonen am Rande der Zelle lokalisiert ist. Nach DR-Belichtung bleibt das Phytochrom zunächst an diesen Stellen, nach einer längeren Dunkelperiode jedoch verteilt es sich wieder und ist nach ca. 2 Stunden im ganzen Zytoplasma zu finden.

4) Auch in einem Sediment aus HR-belichteten Keimlingen, das wie es in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist, hergestellt wurde, ist P_{FR} nicht gleichmäßig verteilt (86). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß es an membranartigen Strukturen lokalisiert ist.

5) Das Bindungsverhalten von Phytochrom in Extrakten stimmt mit dem in-situ bei den immunchemischen Untersuchungen (siehe oben) gefundenen Verhalten überein:

Bei ausreichender Lichtintensität wird schon nach 5 sec HR-Licht ein Maximum an P_{FR} sedimentiert (86), d.h. Phytochrom ist an seine Rezeptoren gebunden. Eine Revertierung des Effektes, d.h. eine Verhinderung der Bindung, wird nur innerhalb eines sehr kurzen, von der Temperatur abhängigen Zeitraumes erreicht. Nach einigen Minuten ist dagegen scheinbar keine Revertierung der Partikelbindung mehr möglich, sondern Phytochrom läßt sich auch als P_R durch Zentrifugation sedimentieren (6,69,91,95,96).

Dies war bisher ein wesentliches Argument gegen die biologische Bedeutung der Partikelbindung von Phytochrom. Die Kinetiken für die Assoziation von P_{FR} an seine Rezeptoren und die Dissoziation

von P_R erklären jedoch dieses Verhalten (86). Die Assoziation läuft innerhalb von Sekunden (maximal 2 Minuten bei $0,5^\circ\text{C}$) ab, die Dissoziation dagegen benötigt viel mehr Zeit (~ 2 h bei 25°C , vgl. in-situ-Rückverteilung von P_R , Lit. 66). Deshalb findet man nach ausreichend langer HR- und anschließender DR-Belichtung partikelgebundenes P_R , dessen Anteil aber abnimmt, je länger eine Dunkelperiode nach der DR-Belichtung dauert (6).

Die Hypothese einer durch P_{FR} geförderten Affinität von Rezeptorstellen für P_R (95,96) ist also nicht notwendig, um das Auffinden von P_R nach R/DR-Belichtung im Sediment zu erklären.

HAUPT und ÜBEL (44) zeigten kürzlich, daß die Chloroplastendrehung in Mougeotia innerhalb einer Minute nach Belichtung mit 15 sec Rotlicht anläuft und nach anschließender DR-Belichtung innerhalb von Sekunden gestoppt wird. Aus diesen Versuchen folgern sie (und ähnliches wird auch aus den anderen phytochromabhängigen Kurzzeiteffekten geschlossen), daß zwischen der Phototransformation von Phytochrom und dem dadurch ausgelösten Effekt keine langdauernden Zwischenreaktionen ablaufen. Vielmehr wird angenommen, daß P_{FR} eine biophysikalische Wirkung auf Membranen ausübt und so die Chloroplastendrehung steuert.

Diese Beobachtungen lassen sich bei Annahme einer Partikelbindung von Phytochrom und bei Berücksichtigung der eben erwähnten Ergebnisse folgendermaßen erklären:

Durch HR-Licht wird Phytochrom in seine physiologisch aktive Form umgewandelt und innerhalb sehr kurzer Zeit (Punkt 5) an spezifische Partikel, wahrscheinlich Membranen (Punkt 3 und 4), gebunden. Dadurch werden die Eigenschaften der Membranen momentan so verändert, daß Folgeprozesse, z.B. die Chloroplastendrehung bei Mougeotia (44), ausgelöst werden. DR-Licht stoppt die Chloroplastendrehung sofort, obwohl das Phytochrom zunächst auch noch als P_R an seinen Rezeptoren sitzt (Punkt 3 und 5). Dies zeigt, daß zur Auslösung einer photomorphogenetischen Wirkung sowohl

die Phototransformation von P_R in P_{FR} als auch

die Assoziation von P_{FR} an Rezeptoren

notwendig ist.

Beides wird nicht nur bei Effekten, die wie die Chloroplastendrehung (44) oder die Unterdrückung der Lipoxygenase-Aktivität (83,84) nach DR-Belichtung sofort gestoppt werden (Photomodulationen, Lit. 123), allgemein als notwendig angenommen, sondern

auch bei den Prozessen, die zunächst phytochromabhängig induziert werden, dann aber nach unterschiedlich langer Zeit unabhängig vom Phytochromsystem ablaufen (Photodeterminationen, Lit. 123), wie z.B. das Entfalten von Getreideblättern (133) oder die Akkumulation von Peroxidase in den Kotyledonen des Senfkeimlings (zitiert in Lit. 123). Das Ende des Phytochrom-einflusses auf solche Effekte bedeutet dann lediglich, daß nach Beendigung der Primärwirkung von Phytochrom Folgeprozesse eingeleitet wurden (z.B. außerhalb der Membranen), die nicht phytochromabhängig sind.

Die wesentlichen Annahmen des von QUAIL und anderen (6,95,96) erarbeiteten Modells zur Erklärung der Phytochromwirkung auf Membranebene, nämlich die Notwendigkeit der Phototransformation zu P_{FR} und dessen Bindung an spezifische Rezeptoren, wird damit heute allgemein akzeptiert, obwohl wichtige Versuche bei Kürbis, auf denen das Modell beruhte, nicht bei anderen Pflanzen reproduzierbar sind.

Erst die Versuche mit Hafer (und inzwischen auch anderen Pflanzen) haben wesentlich zu einer besseren Kenntnis der Phytochrom-Rezeptor-Bindung beigetragen.

6. Zusammenfassung

- 1) Es wird eine Isolierungs- und Reinigungsmethode für Phytochrom aus Hafer (*Avena sativa* L.) beschrieben, die zu einer rund 240fachen Anreicherung des Phytochroms (bezogen auf einen zentrifugierten Extrakt) führt. Die erhaltene Lösung (ca. 10% Ausbeute) hat eine spezifische Aktivität von 0,10-0,12 (zur Definition vgl. S.8) und hat im Bereich von 500-800 nm eine Absorption, die nahezu identisch mit reinem Phytochrom (98) ist.
- 2) Die Reinigung des Phytochroms wird auf einer frühen Stufe durch "batch"-Adsorption an Hydroxylapatit erreicht. Es wurde ein Verfahren ausgearbeitet, bei dem der Hydroxylapatit in fester, pulverförmiger Form zu einem nicht abzentrifugierten Rohextrakt zugesetzt wird. Dies führt zu einer wesentlichen Vereinfachung und Beschleunigung gegenüber herkömmlichen Verfahren, ohne daß es zu Ausbeuteverlusten kommt. Bei Volumenverringerung auf 1/3 wird eine Reinigung um den Faktor 3-4 erzielt. Die weitere Reinigung und Konzentrierung erfolgt durch Säulenchromatographie an Sephadex G-50, Sephadex G-200 und DEAE-Sephadex A-50 - Ionenaustauscher sowie durch Ammoniumsulfatfällung des Phytochroms bei 40-50% Sättigung. Die Sephadex G-200 - Chromatographie bringt eine gute Abtrennung des Phytochroms von den meisten hochmolekularen Stoffen, vor allem von Nukleinsäuren.
- 3) Analytische Gelfiltration von Phytochrom auf Sephadex G-200 zeigte, daß Phytochrom auf frühen Stufen der Aufarbeitung in 3 Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (≥ 800.000 , 360.000, ca. 72.000) vorliegt. Damit wurde nachgewiesen, daß auch im Hafer, wo früher nur die niedermolekulare Form (Molekulargewicht 60-75.000) gefunden wurde, eine hochmolekulare Form mit dem Molekulargewicht 360.000 existiert. Diese Form wird im Verlaufe der Isolierung (durch endogene Proteasen, vgl. Lit. 85) zur niedermolekularen Form abgebaut.
- 4) Die Chromophore der beiden photoreversiblen Formen von Phytochrom haben chemisch unterschiedliche Strukturen. Durch vergleichende Spektraluntersuchungen von Phytochrom und anderen Biliproteiden, bei denen der Einfluß des Apoproteins auf den Chromophor durch Entfalten der Peptidkette ausgeschaltet war, konnte bewiesen werden:

P_R (Xa) hat gegenüber dem Phycocyanin ein geringfügig ver-

längertes (weniger als eine Doppelbindung) Chromophorsystem. Dies wird auf den Ersatz einer Äthylgruppe in Ring D des Phycocyanin-Chromophors durch eine Vinylgruppe zurückgeführt. Im übrigen sind die Chromophore von P_R und Phycocyanin identisch.

P_{FR} hat einen gegenüber P_R und Phycocyanin um die Methin-Doppelbindung zwischen Ring A und B verkürzten Chromophor, dessen Spektraleigenschaften mit denen von Mesobiliviolin (IVa) und Mesobilipurpurin (IVb) übereinstimmen. Durch Oxidation mit Kalium-hexacyanoferrat-(III) wird aus P_R und Phycocyanin ein Chromophor mit den spektralen Eigenschaften des P_{FR} -Chromophors gebildet.

- 5) Der P_{FR} -Chromophor wandelt sich durch Bestrahlung und bei pH-Werten >5 spontan in den P_R -Chromophor um. Die umgekehrte Reaktion ist nicht möglich.
- 6) Es werden Modelle diskutiert, wie eine reversible Umwandlung der beiden Chromophore zustande kommen kann.
- 7) Abbaureaktionen an nativem Phytochrom bestätigen Struktur Xa für P_R . Aus Ring A wird erst durch Eliminierung mit Ammoniak nach Chromsäureabbau in der Kälte Methyl-äthyliden-succinimid (V) erhalten. Dies zeigt, daß Ring A über eine Thioätherbrücke (aus Cystein) mit dem Protein verknüpft war. Ein früher als V angesprochenes Produkt, das nach Chromsäureabbau in der Kälte erhalten wird, wurde als Isatin (IX) identifiziert. Ring C ist ebenfalls am Protein gebunden und liefert erst nach Chromsäureabbau in der Hitze Hämatinsäureimid (VIII). Ring B liefert ebenfalls Hämatinsäureimid, für Ring D wurde Methyl-vinyl-maleinimid als Abbauprodukt wahrscheinlich gemacht.
- 8) Es wurde nachgewiesen, daß die bei Kürbis (*Cucurbita pepo* L.) durch in-vitro-Belichtung und Mg^{2+} -Zugabe erhaltene hohe Partikelbindung von Phytochrom (70%) ein Sonderfall ist. Bei Hafer läßt sich über den in Dunkelkontrollen erhaltenen Wert ($<10\%$) hinaus keine, bei Mais (*Zea mays* L.) nur eine schwache ($<20\%$) in-vitro-Partikelbindung induzieren.
- 9) Durch Belichtung von intakten Keimlingen läßt sich auch bei Hafer eine hohe Partikelbindung induzieren. Bei Extraktion in Gegenwart von 20 mM Mg^{2+} erhält man rund 40% gebundenes Phytochrom.

- 10) Optimale Ausbeuten an gebundenem Phytochrom werden nur bei Extraktion ohne Vorzentrifugation bei 500 g erhalten, da sonst schon ein großer Teil gebundenes P_{FR} sedimentiert wird.
- 11) Die Partikelbindung bei Hafer läßt sich durch hohe Konzentrationen an Mg^{2+} oder NaCl nicht wieder aufheben. Dies zeigt, daß die Bindung nicht wie die in-vitro-Bindung bei Kürbis auf unspezifischen Ionenkräften beruht, sondern wesentlich stabiler sein muß.
- 12) Es wird diskutiert, daß die bei Hafer untersuchte in-vivo-Partikelbindung als repräsentativ für alle Pflanzen gelten kann. Ihre Bedeutung als möglicher erster Schritt der Reaktionskette, die zu einer Photomorphose führt, wird erörtert.

7. Literaturverzeichnis

1. Anderson, G.R., E.L. Jenner und F.E. Mumford, *Biochemistry* 8, 1182 (1969)
2. Anderson, G.R., E.L. Jenner und F.E. Mumford, *Biochim. Biophys. Acta* 221, 69 (1970)
3. Balangé, P.-A., Dissertation, Universität Rouen (Frankreich) 1973
4. Bernardi, G., in: W.B. Jakoby, *Methods in Enzymology*, Bd. 22, S. 325 ff., Academic Press, New York-London 1971
5. Bernardi, G., M.-G. Giro und C. Gaillard, *Biochim. Biophys. Acta* 278, 409 (1972)
6. Boisard, J., D. Marmé und W.R. Briggs, *Plant Physiol.* 54, 272 (1974)
7. Boisard, J., D. Marmé und E. Schäfer, *Planta* 99, 302 (1971)
8. Borthwick, H.A., und R.J. Downs, *Botan. Gaz.* 125, 227 (1964)
9. Borthwick, H.A., S.B. Hendricks, M.W. Parker, E.H. Toole und V.K. Toole, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 38, 662 (1952)
10. Borthwick, H.A., S.B. Hendricks, E.H. Toole und V.K. Toole, *Botan. Gaz.* 115, 205 (1954)
11. Borthwick, H.A., M.W. Parker und S.B. Hendricks, *Am. Naturalist* 84, 117 (1950)
12. Brauner, L., und W. Rau, *Versuche zur Bewegungsphysiologie der Pflanzen*, S. 134, Springer-Verlag, Berlin 1966
13. Briggs, W.R., und H.V. Rice, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23, 293 (1972)
14. Briggs, W.R., W.D. Zollinger und B.B. Platz, *Plant Physiol.* 43, 1239 (1968)
15. Butler, W.L., *J. Optical Soc. Am.* 52, 292 (1962)
16. Butler, W.L., S.B. Hendricks und H.W. Siegelman, *Photochem. Photobiol.* 3, 521 (1964)
17. Butler, W.L., und H.C. Lane, *Plant Physiol.* 40, 13 (1965)
18. Butler, W.L., H.C. Lane und H.W. Siegelman, *Plant Physiol.* 38, 514 (1963)
19. Butler, W.L., K.H. Norris, H.W. Siegelman und S.B. Hendricks, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 45, 1703 (1959)
20. Butler, W.L., H.W. Siegelman und C.O. Miller, *Biochemistry* 3, 851 (1964)
21. Changeux, J.P., und J. Thiéry, in: J. Jarnefeld, *Regulatory functions of biological membranes*, BBA Library, Bd. 11, S. 116 ff., Elsevier, Amsterdam 1968

22. Correll, D.L., und J.L. Edwards, Plant Physiol. 45, 81 (1970)
23. Correll, D.L., J.L. Edwards, W.H. Klein und W. Shropshire jr. Biochim. Biophys. Acta 168, 36 (1968)
24. Correll, D.L., J.L. Edwards und W. Shropshire jr., Photochem. Photobiol. 8, 465 (1968)
25. Crespi, H.L., U. Smith und J.J. Katz, Biochemistry 7, 2232 (1968)
26. Cundiff, S.C., und L.H. Pratt, Plant Physiol. 51, 210 (1973)
27. Dobeneck, H. v., und E. Brunner, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 341, 157 (1965)
28. Du Buy, H.G., und E. Nuernbergk, Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap. 32, 614 (1929)
29. Etzold, H., Planta 64, 254 (1965)
30. Flint, L.H., und E.D. McAlister, Smithsonian Inst. Publs. Misc. Coll. 94, 1 (1935)
31. Fondeville, J.C., H.A. Borthwick und S.B. Hendricks, Planta 69, 357 (1966)
32. Fredricq, H., Plant Physiol. 39, 812 (1964)
33. Fry, K.T., und F.E. Mumford, Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1466 (1971)
34. Fuhrhop, J.-H., A. Salek, J. Subramanian, C. Mengersen und S. Beseke, Liebigs Ann. Chem. 1975, 1131
35. Furuya, M., in: L. Reinhold und Y. Liwschitz, Progress in Phytochemistry, Bd. 1, S. 347 ff., Interscience Publ., London-New York-Sidney 1968
36. Furuya, M., W.G. Hopkins und W.S. Hillman, Arch. Biochem. Biophys. 112, 180 (1965)
37. Gardner, G., C.S. Pike, H.V. Rice und W.R. Briggs, Plant Physiol. 48, 686 (1971)
38. Garner, W.W., und H.A. Allard, J. Agr. Research 18, 553 (1920)
39. Gray, C.H., A. Kulczycka und D.C. Nicholson, J. chem. Soc. 1961, 2268
40. Gray, C.H., A. Kulczycka und D.C. Nicholson, J. chem. Soc. 1961, 2276
41. Haupt, W., Physiol. Vég. 8, 551 (1970)
42. Haupt, W., Bioscience 23, 289 (1973)

43. Haupt, W., G. Mörtel und J. Winkelkemper, *Planta* 88, 183 (1969)
44. Haupt, W., und H. Übel, *Z. Pflanzenphysiol.* 75, 165 (1975)
45. Hendricks, S.B., und H.A. Borthwick, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 2125 (1967)
46. Hendricks, S.B., und H.W. Siegelman, in: M. Florkin und E.H. Stotz, *Comprehensive Biochemistry*, Bd. 27, S. 211 ff., Elsevier, Amsterdam-London-New York 1967
47. Hillman, W.S., und W.L. Koukkari, *Plant Physiol.* 42, 1413 (1967)
48. Hopkins, D.W., W.L. Butler, *Plant Physiol.* 45, 567 (1970)
49. Jaffe, M.J., *Science* 162, 1016 (1968)
50. Kendrick, R.E., und C.J.P. Spruit, *Photochem. Photobiol.* 18, 153 (1973)
51. Klebs, G., *Sitz.-Ber. Heidelberg Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl., Abhandl.* 1916, 4
52. Klebs, G., *Sitz.-Ber. Heidelberg Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl., Abhandl.* 1917, 3, 7
53. Klein, R.M., und P.C. Edsall, *Plant Physiol.* 41, 949 (1966)
54. Köst, H.-P., *Dissertation, Universität München* 1974
55. Köst, H.-P., W. Rüdiger und D.J. Chapman, *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1582
56. Köst-Reyes, E., H.-P. Köst und W. Rüdiger, *Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1594
57. Koukkari, W.L., und W.S. Hillman, *Am. J. Bot.* 54, 1118 (1967)
58. Kroes, H.H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 31, 877 (1968)
59. Kroes, H.H., *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 70, 1 (1970)
60. Kroes, H.H., A. van Rooijen, J.M. Geers und E.H.M. Greuell, *Biochim. Biophys. Acta* 175, 409 (1969)
61. Lane, H.C., H.W. Siegelman, W.L. Butler und E.M. Firer, *Plant Physiol.* 38, 414 (1963)
62. Lange, H., und H. Mohr, *Planta* 67, 107 (1965)
63. Layne, E., in: S. Colowick und N.O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, Bd. 3, S. 447 ff., Academic Press, New York 1957
64. Linschitz, H., und V. Kasche, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1059 (1967)
65. Linschitz, H., V. Kasche, W.L. Butler und H.W. Siegelman, *J. biol. Chem.* 241, 3395 (1966)
66. Mackenzie jr., J.M., R.A. Coleman, W.R. Briggs und L.H. Pratt, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 799 (1975)

67. Marmé, D., Planta 88, 58 (1969)
68. Marmé, D., J. Supramol. Struc. 2, 751 (1974)
69. Marmé, D., J. Boisard und W.R. Briggs, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3861 (1973)
70. Marmé, D., J.M. Mackenzie jr., J. Boisard und W.R. Briggs, Plant Physiol. 54, 263 (1974)
71. Marmé, D., und E. Schäfer, Z. Pflanzenphysiol. 67, 192 (1972)
72. Miller, C.O., R.J. Downs und H.W. Siegelman, Bioscience 15, 596 (1965)
73. Mohr, H., Photochem. Photobiol. 5, 469 (1966)
74. Mohr, H., Biochem. J. 119, 3P (1970)
75. Mohr, H., Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., S. 162 ff. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971
76. Mohr, H., U. Meyer und K. Hartmann, Planta 60, 483 (1964)
77. Mumford, F.E., Biochemistry 5, 522 (1966)
78. Mumford, F.E., und E.L. Jenner, Biochemistry 5, 3657 (1966)
79. Mumford, F.E., und E.L. Jenner, Biochemistry 10, 98 (1971)
80. Nakayama, S., H.A. Borthwick und S. B. Hendricks, Bot. Gaz. 121, 237 (1960)
81. Newman, I.A., und W.R. Briggs, Plant Physiol. 50, 687 (1972)
82. O'Carra, P., C. O hEocha und D.M. Carroll, Biochemistry 3, 1343 (1964)
83. Oelze-Karow, H., und H. Mohr, Photochem. Photobiol. 18, 319 (1973)
84. Oelze-Karow, H., P. Schopfer und H. Mohr, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 51 (1970)
85. Pike, C.S., und W.R. Briggs, Plant Physiol. 49, 521 (1972)
86. Pratt, L.H., persönliche Mitteilung (Nov. 1975)
87. Pratt, L.H., Plant Physiol. 51, 203 (1973)
88. Pratt, L.H., und W.R. Briggs, Plant Physiol. 41, 467 (1966)
89. Pratt, L.H., und W.L. Butler, Photochem. Photobiol. 8, 477 (1968)
90. Pratt, L.H., und R.A. Coleman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2431 (1971)
91. Quail, P.H., Planta 118, 345 (1974)
92. Quail, P.H., Planta 118, 357 (1974)
93. Quail, P.H., Planta 123, 223 (1975)
94. Quail, P.H., Planta 123, 235 (1975)
95. Quail, P.H., D. Marmé und E. Schäfer, Nature - New Biol. 245, 189 (1973)

96. Quail, P.H., und E. Schäfer, J. Membr. Biol. 15, 393 (1974)
97. Rice, H.V., und W.R. Briggs, Plant Physiol. 51, 927 (1973)
98. Rice, H.V., W.R. Briggs und C.J. Jackson-White, Plant Physiol. 51, 917 (1973)
99. Richter, K., Zulassungsarbeit für das Staatsexamen, ausgeführt am Botanischen Institut der Universität München 1972
100. Roux, S.J., Biochemistry 11, 1930 (1972)
101. Roux, S.J., und W.S. Hillman, Arch. Biochem. Biophys. 131, 423 (1969)
102. Rubinstein, D., K.S. Drury und R.B. Park, Plant Physiol. 44, 105 (1969)
103. Rüdiger, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 129 (1967)
104. Rüdiger, W., Habilitationsschrift, Universität Saarbrücken 1968
105. Rüdiger, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1291 (1969)
106. Rüdiger, W., Fortschr. Chem. org. Naturst. 29, 60 (1971)
107. Rüdiger, W., in: K. Mitrakos und W. Shropshire jr., Phytochrome, S. 107 ff., Academic Press, London-New York 1972
108. Rüdiger, W., in: K. Mitrakos und W. Shropshire jr., Phytochrome, S. 129 ff., Academic Press, London-New York 1972
109. Rüdiger, W., und D.L. Correll, Liebigs Ann. Chem. 723, 208 (1969)
110. Rüdiger, W., H.-P. Köst, H. Budzikiewicz und V. Kramer, Liebigs Ann. Chem. 738, 197 (1970)
- 110a. Rüdiger, W., G. Muckle und R. Wagenmann, in Vorbereitung
111. Rüdiger, W., und P. O'Carra, Europ. J. Biochem. 7, 509 (1969)
112. Satter, R.L., P. Marinoff und A.W. Galston, Amer. J. Bot. 57, 912 (1970)
113. Schmidt, W., Anal. Biochem. 59, 91 (1974)
114. Schoch, S., G. Klein, U. Linsenmeier und W. Rüdiger, Tetr. Lett. 28, 2465 (1974)
115. Schoch, S., G. Klein, U. Linsenmeier und W. Rüdiger, Liebigs Ann. Chem., im Druck
116. Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Schweden)
- 116a. Sephadex-Ionenaustauscher, Leitfaden für Ionenaustausch-Chromatographie, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Schweden)

117. Siegelman, H.W., und W.L. Butler, Ann. Rev. Plant Physiol. 16, 383 (1965)
118. Siegelman, H.W., D.J. Chapman und W.J. Cole, in: T.W. Goodwin, Porphyrins and related compounds, S. 107 ff., Academic Press, London 1968
119. Siegelman, H.W., und E.M. Firer, Biochemistry 3, 418 (1964)
120. Siegelman, H.W., und S.B. Hendricks, Federation Proc. 24, 863 (1965)
121. Siegelman, H.W., B.C. Turner und S.B. Hendricks, Plant Physiol. 41, 1289 (1966)
122. Siegelman, H.W., G.A. Wieczorek und B.C. Turner, Anal. Biochem. 13, 402 (1965)
123. Schopfer, P., Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 271 (1973)
124. Smith, H., Nature 227, 665 (1970)
125. Smith, H., und J. Elliot, Plant Sci. Lett. 5, 1 (1975)
126. Spruit, C.J.P., Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 66, 1 (1966)
127. Spruit, C.J.P., und R.E. Kendrick, Planta 103, 319 (1972)
128. Spruit, C.J.P., R.E. Kendrick und R.J. Cooke, Planta 127, 121 (1975)
129. Tanada, T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 376 (1968)
130. Tanada, T., Plant Physiol. 43, 2070 (1968)
131. Taylor, A.O., und B.A. Bonner, Plant Physiol. 42, 762 (1968)
132. Tobin, E.M., und W.R. Briggs, Photochem. Photobiol. 18, 487 (1973)
133. Wagné, C., Physiol. Plant. 18, 1001 (1965)
134. Walker, T.S., und J.L. Bailey, Biochem. J. 107, 603 (1968)
135. Walker, T.S., und J.L. Bailey, Biochem. J. 120, 607 (1970)
136. Walker, T.S., und J.L. Bailey, Biochem. J. 120, 613 (1970)
137. Yu, R., Aust. J. Plant Physiol. 2, 273 (1975)
138. Yu, R., Aust. J. Plant Physiol. 2, 281 (1975)
139. Zimmermann, H., Diplomarbeit, Universität Saarbrücken 1968

Lebenslauf

- 10.11.1945: Geburt in Trier
- April 1952: Einschulung in die Volksschule St. Valerius Trier
- April 1956: Übertritt an das Staatliche Max-Planck-Gymnasium
in Trier
- März 1965: Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlichen
Zweig desselben Gymnasiums
- 1.4.65 - 31.9.66: Ableistung des Grundwehrdienstes
- Okt. 1966: Beginn des Chemie-Studiums an der Universität des
Saarlandes in Saarbrücken
- 24.2.1969: Diplom-Vorprüfung in Chemie
- 28.12.1971: Abschluß des Studiums mit Diplom-Hauptprüfung und
Diplomarbeit an der Universität Saarbrücken
- Jan. 1972: Beginn der Dissertation am Botanischen Institut
der Universität München (Lehrstuhl Phytochemie)
unter Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger.
Gleichzeitig Anstellung als Verwalter der Dienst-
geschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten.
- 7.4.1972: Heirat mit Frl. Christine Kober

